Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Vergleichende Untersuchungen zur Differenzierung des Wirkungsmechanismus von 3-Acetylpyridin und 6-Aminonikotinsäureamid am epididymalen Fettgewebe der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der ehemaligen Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Nicholas Ofori-Nkansah
aus Bechem/Ghana

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546513_0071

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Vergleichende Untersuchungen zur Differenzierung des Wirkungsmechanismus von 3-Acetylpyridin und 6-Aminonikotinsäureamid am epididymalen Fettgewebe der Ratte

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der ehemaligen Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Nicholas Ofori-Nkansah
aus Bechem/Ghana

ehem. Dekan : Professor Dr. med. Herbert Lax

Referent : Professor Dr. med. Franz v. Bruchhausen

Korreferent : Professor Dr. med. Helmut Kewitz

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der ehem. Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am : 16. Oktober 1970

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.		Einleitung	4
2.		Material und Methoden	9
		Herstellung der verwendeten Lösungen	11
	A.	Glucosetransport	14
	I	Allgemeines zur Gewinnung des Fettgewebes	14
	II	Glucoseaufnahme ins Fettgewebe	14
	III	$^{14}CO_2$-Bildung aus markierten Glucosen	15
	B.	Incorporation von (U-^{14}C) -Glucose ins Fettgewebsglykogen	16
	C.	Enzymatische Bestimmungen	17
	I	Bestimmung der Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Kinase im Fettgewebe	17
	IIa)	Bestimmung der Aktivität der Phosphofructokinase im Fettgewebe in Richtung des Fructose-1,6-diphosphats	22
	IIb)	Bestimmung der Aktivität der Phosphofructokinase (aus Kaninchenmuskel) in Richtung des Fructose-6-phosphats	23
3.		Statistische Auswertung der Ergebnisse	25
4.		Ergebnisse	27
	Ia)	Wirkung von 3-Acetylpyridin (3-AP) auf die $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C) -Glucose	27
	Ib)	Wirkung von 3-Acetylpyridin und Insulin auf die $^{14}CO_2$-Bildung aus (1-^{14}C) -Glucose	28
	Ic)	Einfluss von Insulin und 3-Acetylpyridin auf die Glucoseaufnahme ins Fettgewebe	29
	Id)	Wirkung von 3-Acetylpyridin auf die $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C) -Glucose in Abhängigkeit der Inkubationszeit	30
	Ie)	Wirkungen von 3-Acetylpyridin auf die $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C) -Glucose im Fettgewebe unter submaximaler Insulinanregung	31

If) Einfluss von Nikotinsäureamid und Nikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid(phosphat) (NAD(P)) auf die durch 3-AP eingeschränkte $^{14}CO_2$-Bildung aus(U-^{14}C) -Glucose 33

Ig) Wirkung von Ouabain und 3-AP auf die $^{14}CO_2$-Bildung aus(U-^{14}C) -Glucose 35

IIa) $^{14}CO_2$-Bildung aus verschieden markierten Glucosen 36

IIb) $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C) -Pyruvat 38

III Einfluss von 3-AP und 6-Aminonikotinsäureamid (6-AN) auf die Markierung des Fettgewebsglykogens aus(U-^{14}C) -Glucose 39

IV Wirkung von 3-AP, 6-AN, 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid (3-APAD) und 6-Aminonikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (6-ANAD) auf einige glykolytische Enzyme 40

A α Wirkungen von 3-AP und 6-AN auf die Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Kinase im Fettgewebshomogenat 40

β Wirkung der Nucleotide 3-APAD und 6-ANAD auf die Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Kinase im Fettgewebshomogenat 42

B α Einfluss von 3-AP, 6-AN und ihren Nucleotiden 3-APAD und 6-ANAD auf die Aktivität der Phosphofructokinase des Fettgewebes 43

β Wirkung von 6-ANAD auf die Aktivität der Phosphofructokinase des Kaninchenmuskels 45

γ Kinetische Analyse der Phosphofructokinase-hemmung durch 6-ANAD 47

5. Diskussion 50

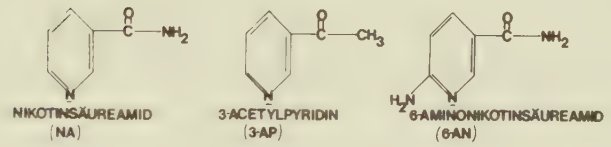
6. Zusammenfassung 59

7. Literatur 61

EINLEITUNG

3-Acetopyridin bzw. 3-Acetylpyridin (3-AP) und 6-Aminonikotinsäureamid (6-AN) können als Analoge des Nikotinsäureamids (NA) aufgefasst werden, das der wasserstoffübertragende Bestandteil der Coenzyme Nikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) und Nikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP) ist.

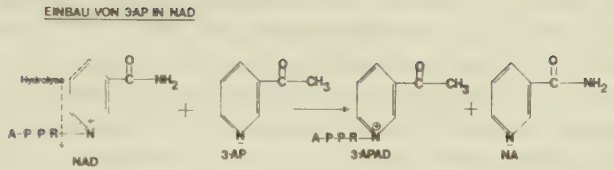
Abb. 1



Die Wirkung der beiden Analogen auf Mäuse, Hunde und Affen unterscheidet sich. Die einmalige Gabe von 3-AP ruft bei Ratten Hyperkinesen , Rollkrämpfe und Lähmungen hervor (HICKS, 1955; COGGESHALL u. Mc LEAN, 1958; FUSE u. KOIKEGAMI, 1961; COPER u. HERKEN, 1962; VEIT, 1965), während nach der Gabe von 6-AN Hypothermie, schlaffe Lähmungen und allgemeine Kachexie das Vergiftungsbild beherrschen (JOHNSON u. Mc COLL, 1955, 1956; HALLIDAY, SLOBODA, WILL u. OLESON, 1957; NANNI et al 1961; COPER u. HERKEN, 1963; BRUNNEMANN, COPER u. HERKEN, 1963). Im Zentralnervensystem kommt es zu Läsionen, die nach 6-AN den Hypothalamus, das Nebennierenmark und das verlängerte Mark bevorzugen (JOHNSON u. Mc COLL, 1955, 1956; STERNBERG u. PHILIPS, 1958; COPER u. HERKEN, 1963; BRUNNEMANN u. COPER, 1963), während

nach 3-AP der Hippocampus am stärksten betroffen wird (COGGESHALL u. Mc LEAN, 1958; FUSE u. KOIKEGAMI, 1961).
SCHNEIDER u. COPER, 1968, fanden nach Gabe von 6-AN an Ratten Schädigungen im reticulären Grau des Rückenmarks vor allem der Intumescentia cervicalis et lumbalis und Formatio recticularis des unteren Hirnstammes und in geringem Masse in den Endkernen der Nn. vestibularis und cochlearis sowie im Nucleus dentatus des Kleinhirns. Dieselben Autoren fanden 6 Monate nach der Intoxikation von 3-Acetylpyridin ausgedehnte Ganglienzelluntergänge in den unteren Oliven und im Nucleus dentatus des Kleinhirns; im Hippocampus konnten lichtmikroskopisch keine Auffälligkeiten erkannt werden.
Durch die gleichzeitige Gabe von Nikotinsäureamid (NA) wird die Bildung der durch 3-AP bzw. 6-AN hervorgerufenen Läsionen aufgehoben (HICKS, 1955; JOHNSON u. Mc COLL, 1956). Die Gabe von Tryptophan unterdrückt die Bildung der durch 6-AN hervorgerufenen Schädigungen (JOHNSON u. Mc COLL, 1956), während sie nach 3-AP unbeeinflusst bleiben (HICKS, 1955).
Durch die hauptsächlich im endoplasmatischen Reticulum der Zelle vorkommende Nucleosidase [NAD(P)-Glycohydrolase EC 3.2.2.6] kann Nikotinsäureamid in vivo sowie in vitro durch 3-AP und 6-AN in NAD und NADP ausgetauscht werden, so dass abnorme Pyridinnucleotide in der Zelle synthetisiert werden können (KAPLAN u. CIOTTI, 1954; 1956; KAPLAN, GOLDIN, HUMPHREYS, CIOTTI u. VENDITTI, 1954; JOHNSON u. Mc COLL, 1956). Dieser Vorgang kann in vitro mit Schweinehirnnucleosidase nachgewiesen werden. Es entsteht, in Anwesenheit von 3-AP als NAD-analoge Verbindung, das 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid (3-APAD) (KAPLAN u. CIOTTI, 1954, 1956; BRUNNEMANN, COPER u. HERKEN, 1962, 1963) - siehe Schema - und als NADP-analoge Verbindung, das 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (3-APADP) (BRUNNEMANN, COPER, u. HERKEN, 1963; BRUNNEMANN u. COPER, 1964). Die Übertragung von 6-AN gelingt in gleicher Weise (JOHNSON u. Mc COLL, 1956; DIETRICH, FRIEDLAND u. KAPLAN, 1958; BRUNNEMANN u. COPER, 1964; BRUNNEMANN , COPER u. NEUBERT, 1964).

Abb. 2



Nach Injektion von 6-AN werden bei Ratten die absolut höchsten Konzentrationen der 6-AN Nucleotide 6-ANAD(P) in Niere, Leber, Lungen und Gehirn gefunden, wobei relativ weit mehr 6-ANADP als 6-ANAD entsteht. Herz und Muskelgewebe weisen dagegen nur geringe Konzentrationen auf (JOHNSON u. Mc COLL, 1956; BRUNNEMANN u. COPER, 1963; HERKEN u. NEUHOFF, 1964). Für das Fettgewebe, das eine sehr hohe Nucleosidaseaktivität besitzt (COPER), liegen bisher keine Befunde vor.

Der Wirkungsmechanismus dieser Antimetaboliten ist noch nicht völlig geklärt. Wahrscheinlich aber beruht ein Teil der Wirkungen auf der Biosynthese der abnormen Nucleotide (DIETRICH et al.,1958). Die bisherigen enzymatischen Untersuchungen mit den abnormen Pyridinnucleotiden haben unterschiedliche Wirkungen erkennen lassen. Während die NADP-abhängigen Reaktionen,(COPER u. NEUBERT, 1963, 1964) mit Ausnahme des"malic enzyme" (NEUBERT u. COPER, 1965) langsamer verlaufen, besitzt 3-APAD in Dehydrogenase-und Reduktase-Systemen unterschiedliche Wirkungen (KAPLAN,CIOTTI u. STOLZENBACH, 1956; NEUBERT, CHAPLAN u. COPER, 1963; CIACCIO,1966). Die 6-AN enthaltenden Pyridinnucleotide 6-ANAD u. 6-ANADP sind völlig unfähig, als Wasserstoffcarrier zu dienen (DIETRICH, FRIEDLAND u. KAPLAN, 1958). Darüber hinaus hemmt 6-ANAD, nicht aber 3-APAD, eine Reihe von phosphatübertragenden Enzymen (v. BRUCHHAUSEN, 1964).

6-AN ruft nach unterschiedlicher Latenzzeit Störungen im Elektrolythaushalt und Kohlenhydratstoffwechsel der Ratte hervor (HERKEN et al., 1964, 1966; v.BRUCHHAUSEN, 1965; v.BRUCHHAUSEN u. HERKEN, 1966; SCHACHT et al., 1965; SCHULTZ et al., 1966). Der Elektrolythaushalt wird zunächst durch eine vermehrte renale Natriumexkretion geändert, die ihren Höhepunkt zwischen der sechsten und achten Stunde p.i. erreicht; es kommt gleichzeitig zu Elektrolytverschiebungen zwischen extra- und intrazellulärem Raum. Ebenfalls relativ früh tritt eine Hyperglykämie auf (v.BRUCHHAUSEN, 1965), die hauptsächlich auf der Freisetzung von Katecholaminen aus den Nebennieren beruht, da sie bei Adrenektomie ausbleibt, (SCHULTZ, SENFT, LOSERT u. SCHACHT). Parallel zu der Hyperglykämie sinkt der Adrenalingehalt der Nebennieren kontinuierlich ab und erreicht nach 16 Stunden nur noch 7 % des Ausgangswertes (SCHACHT, SCHULTZ u. SENFT, 1966; SCHULTZ, SENFT, LOSERT u. SCHACHT, 1966). Bei 3-AP hingegen kommt es während der ersten sechs Stunden zu einer anfänglichen Hypoglykämie, gefolgt von einer anhaltenden Hyperglykämie, die etwa 3 Tage andauert (SCHREIBER, FISCHER u. KMENTOVA, 1962). Die Blutzuckerbewegungen werden aber nicht gleichmässig beobachtet (COPER). Auch die 3-AP-Hyperglykämie nach sehr hohen 3-AP-Dosen hängt von der Freisetzung von Katecholaminen aus den Nebennieren ab (de la MORA et al., 1968).

Am Fettgewebe hebt 6-AN Stoffwechselreaktionen auf, die durch Insulin angeregt werden. So werden die insulin-stimulierbare Glucoseaufnahme in die Zelle, die $^{14}CO_2$-Bildung aus (1-^{14}C)-Glucose, die Inkorporation von (1-^{14}C)-Glucose in Lipide sowie die des (1-^{14}C)-Leucins in Proteine unter Zusatz von 6-AN zu einem insulin-haltigen Fettgewebsmedium gedrosselt. Die gleichzeitige Gabe von Nikotinsäureamid oder NAD hebt die Hemmwirkung des 6-AN auf. Nach v.BRUCHHAUSEN und HERKEN, 1966, tritt die Wirkung des 6-AN erst nach einer Latenzzeit von zwei Stunden ein. Da auch 6-Aminonikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid die insulinstimulierbare Glucoseaufnahme aufhebt, ist zu schliessen, dass für die Wirkung des 6-AN abnorme Nucleotide erforderlich sind. Im Gegensatz zur Hemmung der insulin-stimulierbaren Reaktion erhöht 6-AN den Einbau von (1-^{14}C)-Glucose in das Fettgewebsglykogen. Beim Zusatz von 6-AN zum insulin-haltigen Fettgewebsansatz kommt es zu einer etwa 8-fachen Stimulierung der Glucose-

inkorporation in das Fettgewebsglykogen, obwohl weniger markierte Glucose in die Zelle gelangt ist (v.BRUCHHAUSEN u. HERKEN , 1966). Ähnliche Untersuchungen mit 3-AP sind bisher am Fettgewebe nicht durchgeführt worden.

Das isolierte Fettgewebe eignet sich als Modell für Untersuchungen des Kohlenhydratstoffwechsels besonders deswegen, weil es eine ausgedehnte Oberfläche mit wenig Anschnitten bei der Präparation besitzt, auch während längerer Inkubationszeiten verwendbar bleibt (WINEGRAD u. RENOLD, 1958; DENTON, YORKE u. RANDLE, 1966) und mögliche Ausschüttungen von Katecholaminen unberücksichtigt bleiben können. Es wurden daher weitgehend vergleichende Ver-- suche mit 3-AP, 6-AN und ihren NAD-Analogen durchgeführt, um ihre Wirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel zu differenzieren. Dabei wurden vor allem jene Enzyme berücksichtigt, die für die Regulation der Substratflüsse besondere Bedeutung haben.

Abb. 3

MATERIAL und METHODEN

I - Material

Nikotinsäureamid (NA), Fluka, Buchs/Schweiz

Nikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid(phosphat) (NAD(P)), oxidierte und reduzierte Formen als Dinatriumsalz, Boehringer u. Soehne, Mannheim.

3-Acetylpyridin(3-AP), Firma Rashig, Dr. F. Rashig GmbH., Ludwigshafen am Rhein.

6-Aminonikotinsäureamid (6-AN), Fluka, Buchs/Schweiz.

3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid (3-APAD), Boehringer u. Soehne, Mannheim.

6-Aminonikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (6-ANAD), I. und II. Wahl, Geschenk von Prof. Coper, Berlin. (I. Wahl ist reines 6-ANAD. II. Wahl enthält geringe Verunreinigungen von Nikotinsäureamid und NAD.

Adenosindiphosphat (ADP) als Dinatriumsalz, Boehringer u. Soehne, Mannheim.

Adenosintriphosphat (ATP) als Dinatriumsalz, Boehringer u. Soehne, Mannheim.

Glucose-6-phosphat als Dinatriumsalz, Boehringer u. Soehne, Mannheim.

Fructose-6-phosphat als Dinatriumsalz, Boehringer u. Soehne, Mannheim.

Fructose-1,6-diphosphat als Dinatriumsalz, Boehringer u. Soehne, Mannheim.

Glycerat-3-phosphat als Natriumsalz, Boehringer u. Soehne, Mannheim.

Insulin Kristallsuspension (40 E/ml), Hoechst, Frankfurt/M.

Glucoseoxydase-Blutzuckertestkombination, Boehringer u. Soehne, Mannheim.

Ouabain, Merck, Darmstadt.

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Kaninchenmuskel) (20mg/2ml), Boehringer u. Soehne, Mannheim.

Triosephosphat-Isomerase (Kaninchenmuskel) (10mg/ml), Boehringer u. Soehne, Mannheim.

α-Glycerophosphat-Dehydrogenase (Kaninchenmuskel) (10mg/ml), Boehringer u. Soehne, Mannheim.

3-Phosphoglycerat-Kinase als Fettgewebsextrakt.

Phosphofructokinase als Fettgewebsextrakt

Phosphofructokinase (Kaninchenmuskel), (10mg/ml) Boehringer u. Soehne, Mannheim.

Phosphoglucose-Isomerase (Hefe) (4mg/ml), Boehringer u.Soehne, Mannheim.

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (5mg/ml), Boehringer u. Soehne, Mannheim.

Hexokinase (Hefe), Boehringer u. Soehne, Mannheim.

(1-^{14}C)-Glucose, spez. Akt. 2,86 mCi/mmol, resp. 2,96 mCi/mg mCi/mmol = μCi/μmol, Radiochemical Centre, Amersham.

(6-^{14}C)-Glucose, 4-4 mCi/m

(U-^{14}C)-Glucose, spez. Akt. 2,8 mCi/mmol, resp. 15,7 μCi/mg, Radiochemical Centre. Amersham.

(U-^{14}C)-Natriumpyruvat, spez. Akt. 16,6 mCi/mmol, resp. 151 μCi/mg, Radiochemical Centre, Amersham.

Glykogen, Merck, Darmstadt.

Hyamin, Packard Instruments.

PPO 2,5-Diphenyloxazol (Scintillation Grade), Packard Instruments.

Dimethyl POPOP 1,4 bis 2-(4-Methyl-5-Phenyloxazol Benzol) Scintillation Grade, Packard Instruments.

II - Herstellung der verwendeten Lösungen

a) 3-Acetylpyridin :
0,61 ml 3-Acetylpyridin wurde mittels einer Ballonpipette in 25 ml bzw. 50 ml Messkolben einpipettiert und das Gesamtvolumen auf 25 ml. bzw. 50 ml mit Krebs-Henseleit Medium (Bicarbonatform) gebracht. Diese Lösung entsprach einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-1}$M. bzw. 10^{-1}M. Von der $2 \cdot 10^{-1}$M Lösung kam jeweils 0,3 ml bzw.0,5 ml in einen Ansatz von 3 ml bzw. 5 ml Endvolumen. Die Endkonzentration entsprach somit $2 \cdot 10^{-2}$M.
Von der 10^{-1}M Lösung wurden Verdünnungen von 1:3, 1:10 und 1:30 mit Medium angefertigt. Von diesen Lösungen kam jeweils 0,5 ml in einen Ansatz von 5 ml Endvolumen. Die Endkonzentration entsprach somit 10^{-2}M, $3 \cdot 10^{-3}$M, 10^{-3}M und $3 \cdot 10^{-4}$M.

b) Insulin :
0,125 ml Insulin Kristallsuspension, 40 E/ml wurde in ein 100 ml bzw. 500 ml Messkolben einpipettiert und das Gesamtvolumen mit aqua dest. auf 100 ml bzw. 500 ml aufgefüllt. Hiervon wurde eine Verdünnung von 1:5 mit Medium (1 Teil Insulin + 4 Teile Medium) angefertigt. Von der zweiten Stammlösung wurden Verdünnungen von 1:4, 1:10, 1:20 und 1:40 mit Medium hergestellt.
In die Ansätze von 5 ml Endvolumen kam jeweils 0,5 ml der verschiedenen Konzentrationen. Die Endkonzentrationen entsprachen 1 mE, 200 µE, 50 µE, 20 µE, 10 µE und 5 µE pro ml Ansatz.

c) 6-Aminonikotinsäureamid :
13,7 mg (0,1 m mol) 6-Aminonikotinsäureamid (6-AN) wurden in 10ml Medium gegeben und erwärmt, bis die Substanz in Lösung ging. Diese Lösung entsprach einer Konzentration von 10^{-2}M. 0,5 ml dieser Lösung wurde in einen Ansatz von 5 ml Endvolumen gegeben; die Endkonzentration entsprach 10^{-3}M.

d) Nikotinsäureamid (NA) und NAD(P) :
61,02 mg Nikotinsäureamid wurden in 5 ml Medium gelöst. Hiervon wurde eine Verdünnung von 1:3 mit Medium angefertigt. Von diesen Lösungen kam jeweils 0,5 ml in einen Ansatz von 5 ml Endvolumen. Die Endkonzentrationen entsprachen 10^{-2}M und $3 \cdot 10^{-3}$M.
75,3 mg NAD und 89,0 mg NADP,beide als Natriumsalz,wurden jeweils

in 10 ml Medium gelöst und mit 0,1 N NaOH auf pH 7,3 gebracht. 0,5 ml dieser Lösungen kam in einen Ansatz von 5 ml Endvolumen. Die Endkonzentrationen entsprachen 10^{-3}M.

e) Ouabain :
5,84 mg Ouabain wurden in 10 ml Medium gegeben und erwärmt, bis die Substanz in Lösung ging. 0,5 ml dieser Lösung wurde in einen Ansatz von 5 ml Endvolumen gegeben, die Endkonzentration entsprach 10^{-4}M.

Zusammensetzung des Inkubationsmediums nach KREBS u. HENSELEIT (Bicarbonatform)

Das Medium wurde nach der Originalvorschrift von KREBS u. HENSELEIT (1932) hergestellt. In 130 ml aqua bidest. waren folgende Salze gelöst :

46	mg	KCl
36,6	mg	$CaCl_2$
38,2	mg	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
21,1	mg	KH_2PO_4
900	mg	NaCl
273	mg	$NaHCO_3$

Dieses Bicarbonatmedium enthielt ausserdem 1 %igen Gelatinzusatz, um Insulinverluste durch Anhaften an den Inkubationsgefässen zu vermeiden (NARAHARA, TOMIZAWA, MILLER u. WILLIAMS, 1955 HILL, 1959; BALL, MARTIN u. COOPER, 1959).
Nach Durchperlen des Mediums für 5 Minuten mit einem Gasgemisch (95 % O_2 und 5 % CO_2) und Zugabe der hier zu untersuchenden Substanzen hatte das Inkubationsmedium einen jeweils kontrollierten pH von ca.7,4.

Zusammensetzung des Szintillatortoluols

In 2 Liter Toluol waren folgende Substanzen gelöst :

100 mg Dimethyl POPOP 1,4 bis 2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl) - Benzol (Szintillation Grade)

8 g PPO 2,5-Diphenyloxazol (Szintillation Grade)

Verwendete Pufferlösungen

1) Tris-acetat-Puffer zur Enzymextraktion, pH 7,4

50 mM Tris (Hydroxymethylaminomethan)
50 mM $MgSO_4$ (Magnesiumsulfat)
2 EDTA (Äthylendiaminotetraessigsäure)

2) Tris-acetat-Puffer zur Bestimmung der Aktivität der Phosphofructokinase im Fettgewebe, pH 7,4

50 mM Tris (Hydroxymethylaminomethan)
50 mM KCl (Kaliumchlorid)
15 mM K_2SO_4 (Kaliumsulfat)
5 mM $MgSO_4$ (Magnesiumsulfat)

3) Tris-HCl-Puffer zur Bestimmung von PFK-aktivität (aus Kaninchen-Muskel) , pH 7,4
0,1 M Tris (Hydroxymethylaminomethan)

4) Triäthanolamin-HCl-Puffer, pH 7,6
0,1 M Triäthanolamin 13 , 32 ml ad 1 Liter aqua dest.

5) Zusammensetzung der Hilfsenzyme zur Bestimmung der Phosphofructokinaseaktivität im Fettgewebshomogenat

In 4,75 ml 0,01 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) mit Zusatz von 10 mg Rinderserumalbumin waren folgende Enzyme enthalten :

0,15 ml Aldolase (10 mg/ml)
0,05 ml Triosephosphat-Isomerase (10 mg/ml)
0,05 ml α-Glycerophosphatdehydrogenase (10 mg/ml)

A - GLUCOSETRANSPORT

I - Allgemeines zur GEWINNUNG DES FETTGEWEBES

Die Untersuchungen wurden am epididymalen Fettgewebe der männlichen Wistar-Ratten (Züchter: Tierfarm Hoffmann, Berlin) von 160-200 g Körpergewicht durchgeführt. Sofern in den Versuchsanordnungen nichts anderes angegeben wurde, erhielten die Tiere Trockenfutter "Altromin R 10" (der Firma Altrogge, Lage/Lippe) und Leitungswasser ad libitum.
Die Ratten wurden dekapitiert, das epididymale Fettgewebe schnell und schonend herauspräpariert und der Randschleier jeder Seite zerschnitten und, je nach Versuchsanordnung, auf die Ansätze verteilt.

II - GLUCOSEAUFNAHME INS FETTGEWEBE

Das Fettgewebe wurde wie im "Allgemeines zur Gewinnung des Fettgewebes" beschrieben gewonnen. Der Randschleier jeder Seite wurde auf 12 Ansätze verteilt. Das mittlere Gewebsgewicht (Feuchtgewicht am Ende der Inkubation) betrug ca. 120 mg/Ansatz. Jeder Ansatz enthielt somit Gewebe von 4-5 Ratten. Die so gewonnenen Fettgewebsstückchen wurden in 25 ml Erlenmeyer-Kolben überführt, die mit doppelt durchbohrtem Gummistopfen versehen waren. Das Inkubationsmedium nach KREBS u. HENSELEIT, 1932, (Bicarbonatform) wurde mit 1 %iger Gelatine angereichert und nach Zugabe von 5 µmol D-Glucose und den zu testenden Substanzen mit einem Gasgemisch (95 % O_2 und 5 % CO_2) 5 Minuten durchperlt und dann bei 37°C im schüttelnden Wasserbad mit einer Frequenz von 80 Schlägen/min inkubiert. Jeder Ansatz enthielt ein Endvolumen von 5 ml. Wegen der individuellen und altersmässigen Streubreite umfasste jede Versuchsreihe entsprechende Kontrollansätze. In der Regel wurden 200 µE/ml Insulin und 10^{-2}M 3-AP zugesetzt.
Im Verlauf der 6-stündigen Inkubationszeit wurden vier 0,2 ml-Proben dem Medium entnommen und mit der Glucoseoxydase-Methode (Boehringer u. Soehne, Mannheim) auf den Glucosegehalt untersucht. Aus den so erhaltenen geradlinigen Glucose-Abnahmekurven mit der Zeit wurde die Glucoseaufnahme in µmol/6Std/100 mg Feuchtgewicht des Fettgewebes berechnet.

III - $^{14}CO_2$ - BILDUNG AUS MARKIERTEN GLUCOSEN

Die 25 ml-Erlenmeyer-Kolben wurden mit einem Auffanggefäss unterhalb einer Abdichtungskappe aus Gummi versehen. Dieses Auffanggefäss bestand aus der 1-1,5 cm langen Kappe eines Reagenzglases (1,1 cm Durchmesser), das in ein zu einer seitlichen Lasche beschnittenes Celluloseröhrchen eingehängt und mit einem Gummiring unter der Abdichtungskappe festgehalten wurde (VOSS, 1967). Weiteres Vorgehen erfolgte wie beschrieben unter Glucoseaufnahme. Nach der Begasung wurden zur Einstellung eines Gleichgewichts die Ansätze 45 Minuten praeinkubiert, sodann wurde 0,1 µCi markierte Glucose in den Ansatz einpipettiert, die Kolben mit Gummikappen dicht verschlossen und bei 37°C im schüttelnden Wasserbad inkubiert.

Am Ende der Hauptinkubation wurde 0,4 ml Hyamin mit einer Spritze durch die Gummikappe in das Auffanggefäss eingespritzt, sodann wurde in das Medium 0,25 ml 10 %ige H_2SO_4 mit einer Spritze mit langer Kanüle eingespritzt und die Ansätze 30 Minuten weiterinkubiert. Als eine organische Base nahm Hyamin das während der Inkubation sich bildende gasförmige, sowie das durch die Schwefelsäure aus Karbonat freigesetzte Kohlendioxyd auf. Danach wurden die Auffanggefässe mit Inhalt ($^{14}CO_2$-enthaltendes Hyamin) in Zählgefässe mit 10 ml Scintillatortoluol übertragen und die Radioaktivität im Tricarb-Gerät (Tricarb-Scintillationsspektrometer Mod. 314 Ex 3375, der Fa. Packard Instr. GmbH., Frankfurt/M) gezählt. Die erhaltenen Zählwerte wurden durch Abzug der Leerwerte und Berücksichtigung der Zählausbeuten auf Zerfälle/min und dann auf vorliegende Radioaktivitätsmenge nCi/Inkubationszeit/100 mg Fettgewebe (Feuchtgewicht) umgerechnet.

E - INCORPORATION VON U-^{14}C) - GLUCOSE INS FETTGEWEBSGLYKOGEN

Die Versuchsanordnungen waren wie unter $^{14}CO_2$ - Bildung angegeben, allerdings unter Zusatz von 1 μCi (U-^{14}C)- Glucose statt 0,1 μCi. Die Inkubation im schüttelnden Wasserbad bei 37°C betrug 4 Stunden mit einer Praeinkubation von 2 Stunden. Das mittlere Gewebsgewicht (Feuchtgewicht am Ende der Inkubation) betrug ca. 250 mg.

Am Ende der Inkubation wurde 0,4 ml Hyamin in das Auffanggefäss gespritzt und die Fettgewebsstückchen wurden entnommen. Die Kolben wurden dann sofort wieder verschlossen und anschliessend, wie üblich, 0,25 ml 10 %iger H_2SO_4 eingespritzt, 30 Minuten weiterinkubiert und behandelt wie unter $^{14}CO_2$- Bildung.

Das Fettgewebe wurde in 10 ml Zentrifugengläser eingebracht, die 10 mg Glykogen und 2 ml 30 %ige Kalilauge enthielten. Die weitere Aufbereitung wurde nach der Methode von GOOD, KRAMER u. SOMOGYI (1933) ausgeführt und durch 4-maliges Waschen mit Äthanol (Zentrifugieren bei 3.000 Rpm 15 Minuten lang) von begleitender Radioaktivität befreit. Die so erhaltene Glykogenfraktion wurde mit 5 ml 1 N H_2SO_4 drei Stunden im kochenden Wasserbad hydrolysiert und mit 1 N Kalilauge neutralisiert. Zur Impulsauszählung dienten 0,2 ml des Neutralisationsproduktes in einem Gemisch von 4 ml Äthanol und 8 ml Toluol.

C - ENZYMATISCHE BESTIMMUNGEN

I a) Bestimmungen von 3-Phosphoglycerat-Kinase (EC 2.7.2.3.) im Fettgewebe

Die Gewinnung des Fettgewebes erfolgte wie eingangs beschrieben. Der Extraktionspuffer (Tris-acetat-puffer, pH 7,4) wurde nach der Methode von POGSON u. DENTON, (1966) hergestellt, (siehe Seite 13).
Statt Äthylenglycol-bis-(2-aminoäthyl)-tetraessigsäure (EGTA), wie es von diesen Autoren angegeben ist, wurde EDTA verwendet. Diese Lösung wurde mit 1 N Essigsäure auf ein pH von 7,4 gebracht.

Die gewonnenen Fettgewebeschleier wurden kurz in Extraktionspuffer gewaschen, abgetupft, gewogen und mit 3 Vol / g Fettgewebe Trisacetatpuffer pH 7,4 (Extraktionspuffer) im POTTER-Homogenisator bei 4°C homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 2.300 g 20 Min. lang bei 2°C in einer PHYWE Zentrifuge, Modell 220 $V_3 \sim 50$ HZ (PHYWE, A.G., Göttingen) zentrifugiert. Die supernatante Flüssigkeit wurde dekantiert und entweder im Kühlschrank aufbewahrt oder sofort zur enzymatischen Bestimmung verwendet.
Die 3-Phosphoglycerat-Kinase katalysiert die Umwandlung von 1,3-Diphosphoglycerat in 3-Phosphoglycerat. Diese Reaktion ist unkehrbar, man kann deshalb von dem handelsüblichen 3-Phosphoglycerat ausgehend die Bildung des instabilen Acylphosphats-1,3-Diphosphoglycerat-unter Zusatz von ATP und Mg^{++} Ionen erzwingen. Die Umwandlung des entstandenen 1,3-Diphosphoglycerats in Glycerinaldehyd-3-phosphat mit Hilfe von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase wurde durch Messung der Extinktionsabnahme bei der Oxidation von NADH in NAD bei 340 mμ im Beckman DK 2 Spektrophotometer bei Zimmertemperatur bis zum Höchstwert verfolgt. Die Messung beruht auf der Tatsache, dass sich das Extinktionsmaximum des NADH bei der Umwandlung in NAD stöchiometrisch vermindert. Durch Kopplung des Systems mit Triosephosphat-Isomerase wurde die Gleichgewichtslage begünstigt.

Die beteiligten Reaktionen waren demnach :

3-Phosphoglycerat + ATP $\xrightleftharpoons{PGK + Mg^{++}}$ 1,3-Diphosphoglycerat + ADP *)

1,3-Diphosphoglycerat + NADH - H $\xrightleftharpoons{GAPDH}$ Glycerinaldehyd-3-phosphat + NAD

Glycerinaldehyd-3-phosphat $\xrightleftharpoons{TIM}$ Dihydroxyacetonphosphat

Die Bestimmung erfolgte in 0,1 M Triäthanolaminpuffer pH 7,6 in einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke. Das Reaktionsgemisch von 3 ml Endvolumen enthielt im Einzelnen folgende Zusätze : 25 µmol 3-Phosphoglycerat, 2 µmol ATP, 0,6 µmol NADH, 10 µmol Magnesiumsulfat, 50 µg Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, 20 µg Triose-phosphat-Isomerase 0,2 ml 3-Phosphoglycerat-Kinase als Fettgewebsextrakt und 3-AP ($2 \cdot 10^{-2}$M) bzw. 6-AN (10^{-3}M). Als Starter diente 3-Phosphoglycerat. Die Kontrollküvette enthielt in der Regel alle Zusätze ausser dem Substrat 3-Phosphoglycerat. Als Mass für die Umsatzgeschwindigkeit wurde die Oxydation von NADH (in nµmol/min/g) Fettgewebe verwendet..
Der Berechnung des gebildeten NAD wurde ein Extinktionskoeffizient von 6,22 cm^3/mol (UMBRECHT, BURRIS und STAUFFER, 1959) zugrunde gelegt.

*)
Abkürzungen :

3-PG	= 3-Phosphoglycerat
ATP	= Adenosintriphosphat
ADP	= Adenosindiphosphat
PGK	= 3-Phosphoglycerat-Kinase
GAPDH	= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
TIM	= Triosephosphat- Isomerase
NAD(H)	= oxydierte u. reduzierte Form des Nikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotids

a) Wirkung von 3-Acetylpyridin auf 3-Phosphoglycerat-Kinase des Fettgewebes

Die Versuchsanordnungen waren wie schon beschrieben für 3-Phosphoglycerat-Kinase. 3-AP wurde in Konzentrationen von $2 \cdot 10^{-2}$M, 10^{-2}M, $2 \cdot 10^{-3}$M, und 10^{-3}M zugegeben.

b) Adenosintriphosphat als Substrat

Als variables die Reaktionsgeschwindigkeit limitierendes Substrat diente Adenosintriphosphat. 3-AP ($2 \cdot 10^{-2}$M) wurde zugesetzt.

c) 3-Phosphoglycerat als Substrat

Der Ansatz von 3 ml Endvolumen enthielt jeweils 10 µmol, 5 µmol, 2 µmol, 1 µmol und 0,5 µmol 3-Phosphoglycerat als variables die Reaktionsgeschwindigkeit limitierendes Substrat. 3-AP ($2 \cdot 10^{-2}$M) diente als Zusatz.

I b) Bestimmung der Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Kinase mit der Acylphosphat-Methode

Da die beschriebene Bestimmung der 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität im Fettgewebe Gebrauch von einem NAD-abhängigen Schritt macht, wurde zur Bestimmung der Beeinflussbarkeit dieses Enzyms durch NAD-Analoga des 3-Acetylpyridin und 6-Aminonikotinsäureamids die Acylphosphat-Methode nach Lipmann und Tuttle (1945) benutzt.
Das Prinzip dieser Bestimmungsmethode beruht darauf, das Acylphosphate in der Lage sind, Verbindungen mit Hydroxylamin einzugehen, wobei sich Hydroxamsäure bildet. Die Hydroxamsäure bildet mit 3-wertigen Eisenverbindungen (Fe^{3+}-Ionen) eine violette Komplexverbindung, die bei der Wellenlänge zwischen 480 - 540 m μphotometrisch bestimmt werden kann.

$$\underset{\text{Hydroxylamin}}{H_2NOH} + \underset{\text{Acylphosphat}}{R \cdot COOPO_3^{2-}} \longrightarrow \underset{\text{Hydroxamsäure}}{R \cdot CO \cdot NHOH} + HOPO_3^{2-}$$

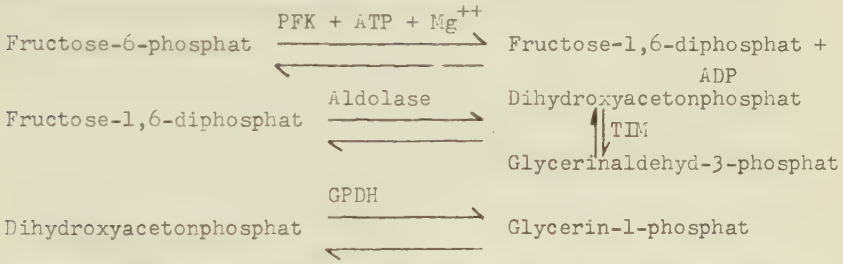
Die hierzu benötigten Reagenzien waren wie folgt :
4 M Hydroxylamin pH 6,4 (4 M Hydroxylamin-HCl + 3,5 M NaOH)

1 M Acetatpuffer (1 Teil 0,1 M Essigsäure + 3 Teile 0,1 M Natriumacetatlösung)
12 %ige Trichloressigsäure
5 %ige Eisenchloridlösung ($FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$) in 0,1N HCl)
Konz. HCl (1:4)
3-Phosphoglycerat-Kinase als Fettgewebsextrakt wurde wie schon beschrieben hergestellt.
Der Ansatz von 3 ml Endvolumen war wie folgt zusammengesetzt : 1 ml 4 M Hydroxylamin-HCl-NaOH-Lösung pH 6,4, 0,8 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 5,4, 10 μmol 3-Phosphoglycerat, 4 μmol ATP, 10 μmol Magnesiumsulfat, 0,2 ml 3-Phosphoglycerat-Kinase als Fettgewebsextrakt. Dies wurde mit 3-APAD (10^{-3}M) bzw. 6-ANAD ($2 \cdot 10^{-4}$M) versetzt. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne 3-APAD bzw. 6-ANAD-Zusatz. Die 30 Min. Inkubation im schüttelnden Wasserbad erfolgte in 10 ml Zentrifugengläsern. Die Hydroxylamin HCl-NaOH-Lösung diente zum Auffangen des sich während der Inkubation bildenden 1,3-Diphosphoglycerats.

Am Ende der Inkubation wurde zur Deproteinisierung 1 ml 12 %iger Trichloressigsäure in das Reaktionsgemisch einpipettiert, dann wurde zur Farbentwicklung je 1 ml konz. HCl (1:4) und 5 %ige Eisenchloridlösung zugegeben. Zur Messung der Extinktion bei der Wellenlänge 492 mμ im Eppendorf Photometer diente der klare violette Überstand.

II a) Bestimmung der Phosphofructokinaseaktivität im Fettgewebshomogenat in Richtung des Fructose-1,6-diphosphats

Phosphofructokinase aus Fettgewebe wurde nach der Methode von PEGSON und DENTON (wie modifiziert für 3-Phosphoglycerat-Kinase) extrahiert. Als Hilfsenzyme für die Bestimmung dienten Aldolase, Triosephosphat-Isomerase und α-Glycerophosphat-Dehydrogenase. Ausgehend vom Fructose-6-phosphat wurde die Bildung von Fructose-1,6-diphosphat erzielt, das durch Kopplung mit Aldolase und Triose-phosphat-Isomerase in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat überführt wird. Die Umwandlung des entstandenen Dihydroxyacetonphosphats in Glycerin-1-phosphat mit Hilfe von α-Glycerophosphat-Dehydrogenase wurde durch Messung der Extinktion der Oxydation von NADH in NAD bei 340 mμ in Beckman DK 2 Spektrophotometer bei Zimmertemperatur bis zum Höchstwert verfolgt.



Die Bestimmungen erfolgten in 50 mmolarem Trisacetatpuffer pH 7,4, (PEGSON u. DENTON, 1966), siehe Seite 13, in einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke. Das Reaktionsgemisch von 3 ml Endvolumen enthielt 10 μmol Fructose-6-phosphat, 4 μmol ATP, 7,5 μmol Magnesiumsulfat, 0,6 μmol NADH, 0,2 ml Phosphofructokinase als Fettgewebsextrakt, 60 μg Aldolase, 20 μg Triosephosphat-Isomerase und 20 μg α-Glycerophosphat-Dehydrogenase. Als Zusätze dienten 3-AP (10^{-2}M), 6-AN (10^{-3}M), 3-APAD (10^{-3}M) und 6-ANAD ($1{,}2.10^{-3}$M; 3.10^{-4}M; $1{,}5.10^{-4}$M).

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Fructose-6-phosphat in Gang gesetzt, und die Kinetik mit und ohne die zu testenden Substanzen geschrieben. Die übrigen Komponenten zeigten keine Extinktionsänderungen. Bei der Berechnung des gebildeten NAD wurde ein Extink-

tionskoeffizient von 6,22 cm^3/mol (UMBREIT, BURRIS u. STAUFFER, 1959) zugrundegelegt.

II b) Bestimmung der Phosphofructokinaseaktivität (aus Kaninchenmuskel) in Richtung des Fructose-6-phosphats

Um jede NAD-abhängige Reaktion im enzymatischen Messsystem zu vermeiden, wurde folgende Methode benutzt:
Ausgehend vom Fructose-1,6-diphosphat wurde die im Gleichgewicht nicht begünstigte Rückreaktion - nämlich die Bildung von Fructose-6-phosphat - erzwungen. Das entstandene Fructose-6-phosphat wurde mit Hilfe von Phosphoglucose-Isomerase in Glucose-6-phosphat überführt. Die Umwandlung des Glucose-6-phosphats in 6-Phosphogluconat unter der Einwirkung von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wurde durch Messung der Extinktion bei der Reduktion von NADP in $NADPH_2$ bei 340 mμ in Beckman DK 2 Spektrophotometer bei Zimmertemperatur bis zum Höchstwert verfolgt.

Fructose-1,6-diphosphat + ADP $\xrightleftharpoons{PFK + Mg^{++}}$ Fructose-6-phosphat + ATP

Fructose-6-phosphat $\xrightleftharpoons{PGI}$ Glucose-6-phosphat

Glucose-6-phosphat $\xrightleftharpoons{G\text{-}6\text{-}PDH}$ 6-Phosphogluconat

Die Bestimmung erfolgte in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 in einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke.
Im einzelnen enthielten die Ansätze von 3 ml Endvolumen 10 μmol Fructose-1,6-diphosphat, 12 μmol ADP, 10 μmol $MgSO_4$, 0,6 μmol NADP, 100 μg Phosphofructokinase, 20 μg Phosphoglucose-Isomerase, 25 μg Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Als Zusätze dienten 3-AP (10^{-2}M), 6-AN (10^{-3}M), 3-APAD (10^{-3}M) und 6-ANAD (2.10^{-4}M).
Zur Bestimmung der Aktivität dieses Enzyms in Abhängigkeit der 6-ANAD Konzentration lag 6-ANAD in Konzentrationen von 8.10^{-4}M, 5.10^{-4}M, 2.10^{-4}M und 10^{-4}M vor.
Die Reaktion wurde durch Fructose-1,6-diphosphat eingeleitet. Der Berechnung des gebildeten $NADPH_2$ wurde ein Extinktions-

koeffizient von 6,22 cm^3/mol (UMBRECHT, BURRIS u. STAUFFER, 1959) zugrundegelegt.

Abhängigkeit der Phosphofructokinase (Kaninchenmuskel)-Reaktion von den Substratkonzentrationen

a) Fructose-1,6-diphosphat als Substrat

Die Versuchsanordnungen waren wie für Phosphofructokinase beschrieben.

Der Ansatz von 3 ml Endvolumen enthielt 12 µmol ADP, 10 µmol $MgSO_4$, 0,6 µmol NADP, 100 µg Phosphofructokinase, 20 µg Phosphoglucose-Isomerase, 25 µg Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Fructose-1,6-diphosphat in Mengen von 60 µmol, 30 µmol, 20 µmol, 10 µmol, 5 µmol, 2 µmol und 1 µmol. 6-ANAD lag in einer Konzentration von (z. 10^{-4}M) vor.

b) Adenosindiphosphat als Substrat

Das Reaktionsgemisch von 3 ml Endvolumen enthielt 10 µmol Fructose-1,6-diphosphat, 10 µmol $MgSO_4$, 0,6 µmol NADP, 100 µg Phosphofructokinase, 20 µg Phosphoglucose-Isomerase, 25 µg Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und ADP in Konzentrationen von 6,67 . 10^{-3}M, 3,33 . 10^{-3}M, 6,67 . 10^{-4}M, 3,33 . 10^{-4}M, 1,67 . 10^{-4}M und 6,7 . 10^{-5}M und 6-ANAD (10^{-4}M).

Als Starter diente Fructose-1,6-diphosphat.

Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Fehlerrechnung erfolgt nach dem STUDENT-Test (t-Test). Zwei Reihen (mit n Werten) werden miteinander verglichen, wobei x_{i_1} den Einzelwert der Reihe 1 mit n_1-Werten und x_{i_2} den Einzelwert aus der Reihe 2 mit n_2-Werten darstellt.

Der Mittelwert $\bar{X}$ ist die Summe der Einzelwerte, dividiert durch die Anzahl der Werte jeder Reihe.

$$\bar{X}_1 = \frac{\sum x_{i_1}}{n_1}$$

$$\bar{X}_2 = \frac{\sum x_{i_2}}{n_2} \quad .$$

Die Abweichung vom Mittelwert ist dann $\bar{X} - x_i$.

Durch Mittelung entsteht

$$\pm \frac{\sum \bar{X} - x_i}{n}$$

die sogenannte Standardabweichung, die ein Mass der Streuung ist.

Daraus ergibt sich als mittlerer Fehler des Mittelwertes

$$\varepsilon^2 = \frac{\sum (\bar{X} - x_1)^2}{n_1 (n_1 - 1)}$$

Der t-Wert, die Signifikanzschranke für die Anzahl der Freiheitsgrade errechnet sich nach der folgenden Formel, in die beide Reihen eingehen :

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2}}$$

Der Index der Signifikanz (p) wird auf den t-Tafeln von PÄTAU (1943) mit Hilfe von t-Wert und F = Zahl der Freiheitsgrade graphisch abgelesen.

($F = n_1 + n_2 - 2$).

Als Signifikanzgrenzen werden angenommen

$p < 0{,}0025$ - signifikant

$p < 0{,}05$ ein Unterschied

$p > 0{,}05$ kein Unterschied.

E R G E B N I S S E

I - A Wirkung von 3-Acetylpyridin (3-AP) auf die $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C) - Glucose.

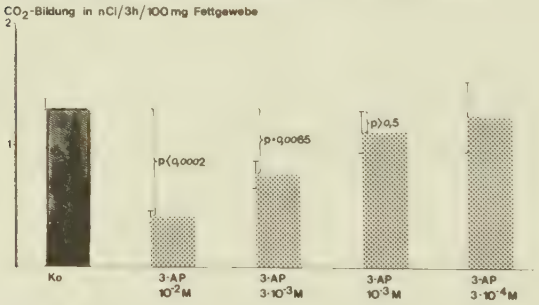
3-AP bewirkt als Zusatz zum glucosehaltigen Fettgewebsansatz eine Hemmung der $^{14}CO_2$-Bildung. Wie die Abb. 4 zeigt, drückt sich diese Wirkung bei einer 3-AP-Konzentration von 10^{-2}M in einer 60-70 %igen Hemmung aus ($p \leq 0{,}0002$). Bei einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-3}$M beträgt diese Hemmung 35 % ($p = 0{,}0065$) und bei 10^{-3}M um 15 % ($p = 0{,}5$).

Daraus ergibt sich eine halbmaximale Hemmkonzentration von $7{,}2 \cdot 10^{-3}$M. Geringere Konzentrationen wie $3 \cdot 10^{-4}$M, 10^{-4}M und $3 \cdot 10^{-5}$M zeigen selbst bei längerer Inkubationsdauer (5 Stunden) keinerlei Hemmwirkung im Vergleich zu Kontrollansätzen.

Abb. 4

Wirkung von verschiedenen 3·Acetylpyridin·Konzentrationen auf die CO_2·Bildung aus U·^{14}C·Glucose im epididymalen Fettgewebe der Ratte

D-Glucose 1 µmol/ml Ansatz, 0,1 µCi (U-^{14}C)-Glucose in 5 ml Ansatz, 3h Inkubation

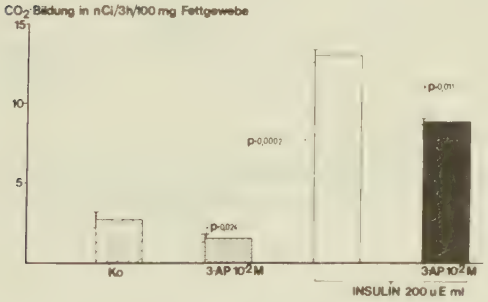


I - B Wirkung von 3-Acetylpyridin und Insulin auf die $^{14}CO_2$-Bildung aus (1-^{14}C)-Glucose

Im Abschnitt(I A) wurden durch Messung der $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)-Glucose die geeigneten 3-AP Konzentrationen ermittelt, die auf das Ausmass der $^{14}CO_2$-Bildung eine deutliche Hemmwirkung zeigen. Für die Messung des Glucosetransportes ist (1-^{14}C)-Glucose geeigneter, weil die Decarboxylierung nach dem ersten Schritt des Pentose-Phosphat-Weges am C_1-Atom erfolgt.
3-AP (10^{-2}M) hemmt die $^{14}CO_2$-Bildung aus (1-^{14}C)-Glucose um ca. 40 % (ohne Insulin) und um ca. 32 % bei der Anwesenheit von Insulin. Das Ausmass der insulinbedingten Stimulation bei der $^{14}CO_2$-Bildung gleicht etwa dem der Glucoseaufnahme. Unterschiede ergeben sich aber bei der prozentualen Hemmung durch 3-AP, die bei der Glucoseaufnahme (vergl. I-C) höher lag, nämlich bei 70 % (ohne Insulin) respektive 60 % (mit Insulin).

Abb. 5

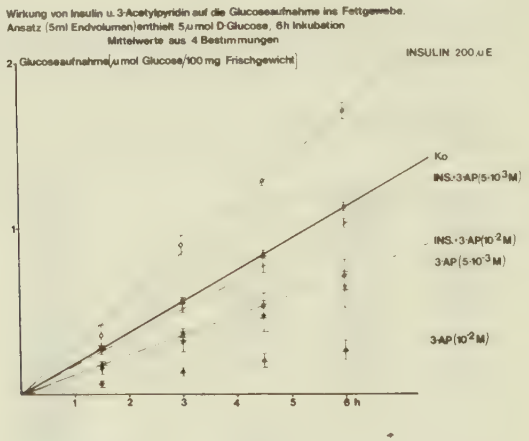
Wirkung von 3-Acetylpyridin u. Insulin auf die CO_2-Bildung aus[1-^{14}C]Glucose im epididymalen Fettgewebe der Ratte.[5ml Endvolumen, 5µmol D-Glucose u. 0,1µCi [1-^{14}C]Glucose, 3h Inkubation]



I - C Einfluss von Insulin und 3-Acetylpyridin auf die Glucose-aufnahme ins Fettgewebe.

3-Acetylpyridin (3-AP) als Zusatz zum glucosehaltigen Fettgewebsansatz bewirkt konzentrationsabhängig eine Hemmung der basalen Glucoseaufnahme - gemessen an der Glucoseabnahme im Aussenmedium. Ebenso wird der durch Insulin angeregte Glucosetransport bei der gleichzeitigen Anwesenheit von 3-AP gehemmt.
Wie aus der nachfolgenden Abbildung hervorgeht, ist dieser Hemmeffekt bereits 1 1/2 Std. nach Inkubationsbeginn sichtbar und bleibt über eine Inkubationsdauer von 6 Stunden konstant. Er beträgt mit 3-AP (10^{-2}M) ohne Insulin im Vergleich zu Kontrollansätzen ca. 70 % ($p = 0{,}00015$); bei der gleichzeitigen Anwesenheit von Insulin rund 60 % ($p = 0{,}00021$).

Abb. 6

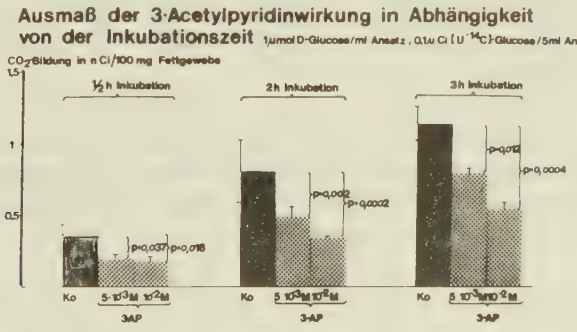


I - D Wirkung von 3-AP auf die $^{14}CO_2$-Bildung bei verschiedenen Inkubationszeiten.

Am Fettgewebe tritt die Wirkung des 6-AN erst nach einer Latenzzeit von mindestens zwei Stunden ein. Während dieser Zeitspanne werden die wirksamen abnormen Nucleotide gebildet (v. BRUCHHAUSEN u. HERKEN 1966). Es lag deshalb die Frage nahe, zu prüfen, inwieweit dies auch bei 3-AP zutrifft.

Hierbei wurde Fettgewebe mit und ohne 3-AP Zusatz nach der üblichen Methode 1/2 Stunde, 2 Stunden und 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Für den Zeitraum Null dienten die Ansätze, die nach der Zugabe von 3-AP sofort mit Hyamin und Schwefelsäure bei 37°C abgestoppt wurden.
Es zeigt sich, dass 3-AP im Gegensatz zu 6-AN, einen schnelleren Wirkungseintritt zeigt. Bereits eine halbe Stunde nach Inkubationsbeginn ist der Prozentsatz der Hemmwirkung des 3-AP auf die $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)-Glucose maximal erhöht und lässt sich über eine Inkubationsdauer von 3 Stunden nicht mehr steigern. In einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-3}$M beträgt er nach 1/2 Stunde 45,6 % ($p = 0{,}037$), nach 2 Stunden 40,1 % ($p = 0{,}002$) und nach 3 Stunden 37,8 % ($p = 0{,}012$). Noch deutlicher ist diese Hemmwirkung in einer Konzentration von 10^{-2}M. Bereits 1/2 Stunde nach Inkubationsbeginn ist die $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)-Glucose im Vergleich zur Kontrolle zu 54 % gehemmt ($p = 0{,}016$), nach 2 Stunden zu 57,8 % ($p < 0{,}0002$) und nach 3 Stunden zu 54,4 % ($p = 0{,}0004$).

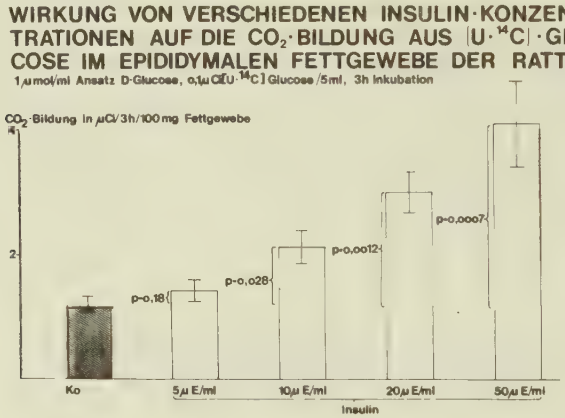
Abb. 7



I - E Wirkungen von 3-Acetylpyridin auf die $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)-Glucose im Fettgewebe unter submaximaler Insulinanregung.

Insulin stimuliert die Glucoseaufnahme bzw. $^{14}CO_2$-Bildung-konzentrationsabhängig bis etwa 50 µE/ml.

Abb. 8



Darüberliegende Konzentrationen stimulieren nur geringfügig. Untersuchungen im Bereich submaximaler Insulinkonzentrationen erleichtern die Deutung der entgegengesetzten Wirkungen, wie sie durch Insulin und 3-AP vorliegen.

Es wurden verschiedene 3-AP-Konzentrationen in Gegenwart von 20 µ E/ml Insulin verwendet.

Die Abb. 9 verdeutlicht, dass 3-AP in einer Konzentration von $2{,}5 \cdot 10^{-3}$M die durch Insulin angeregte $^{14}CO_2$-Bildung zu ca. 17 % aufhebt ($p = 0{,}028$).

Bei einer 3-AP Konzentration von $5 \cdot 10^{-3}$M beträgt die Hemmung ca. 40 % ($p = 0{,}0065$); bei 10^{-2}M 66 % ($p < 0{,}0002$), während eine Konzentration von $2 \cdot 10^{-2}$M eine Hemmwirkung von ca. 86 % zur Folge hat ($p = 0{,}00045$). Ohne Insulin hemmt diese 3-AP Konzentration zu 82 % ($p < 0{,}0002$).

Abb. 9

Wirkung verschiedener 3-Acetylpyridin-Konzentrationen auf die Insulin-abhängige CO_2-Bildung aus U-^{14}C-Glucose im epididymalen Fettgewebe der Ratte

1 µmol/ml Ansatz D-Glucose, 0,1 µC[U-^{14}C]-Glucose/5 ml Ansatz, 3h Inkubation

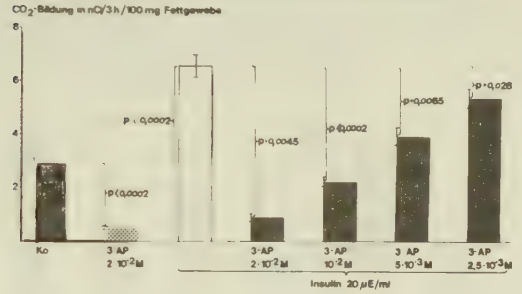


Abb. 10

Ausmaß des 3-Acetylpyridin-Hemmeffektes bei steigenden Insulin-Konzentrationen

1 µmol/ml Ansatz D Glucose, 0,1 µC[U-^{14}C]-Glucose/5 ml Ansatz, 3h Inkubation

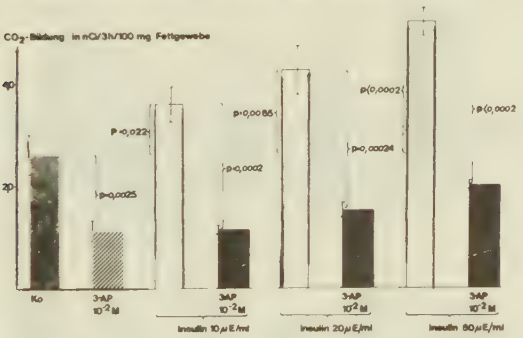


Abb. 10 veranschaulicht die hemmende Wirkung des 3-AP (10^{-2}M) auf die durch verschiedene Insulin-Konzentrationen angeregte $^{14}CO_2$-Bildung. Daraus geht hervor, dass stets etwa 60-70 % der durch Insulin angeregten Reaktion durch 3-AP hemmbar ist.

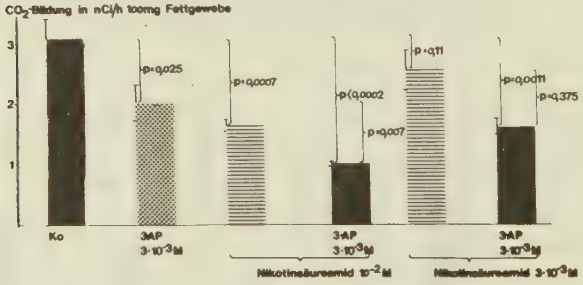
I - F Einfluss von Nikotinsäureamid und Nikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (phosphat) auf die durch 3-AP eingeschränkte $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)-Glucose.

Wie schon erwähnt, schränkt Nikotinsäureamid (NA) viele Erscheinungen nach 3-AP und 6-AN in vivo ein. NA und NAD verhindern auch die Wirkung des 6-AN auf den Glucosetransport. Im Gegensatz hierzu bewirkt der Zusatz von NA (10^{-2}M) und ($3 \cdot 10^{-3}$M) bzw. NAD (10^{-3}M) zum 3-AP-haltigen Fettgewebsansatz eine verstärkte Hemmung der $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)-Glucose. In den angegebenen Konzentrationen führen NA und NAD aber auch selbst (d.h. ohne 3-AP) zu einer Hemmung der $^{14}CO_2$-Bildung, die bei NA (10^{-2}M) ca. 47 % ($p = 0{,}0007$); NA ($3 \cdot 10^{-3}$M) ca. 17 % ($p = 0{,}11$);

Abb. 11

Wirkung von Nikotinsäureamid und 3-Acetylpyridin auf die CO_2-Bildung aus (U-^{14}C)-Glucose im epididymalen Fettgewebe der Ratte

D-Glucose 1 µl mol/ml Ansatz, 0,1 µ Ci [U-^{14}C] Glucose/5 ml Ansatz /3h Inkubation.



und bei NAD (10^{-3}M) ca. 23 % ($p = 0{,}07$) beträgt.
NADP (10^{-3}M) zeigt keinerlei Hemmwirkung im Vergleich zu Kontrollansätzen.

Abb. 12

WIRKUNG VON NIKOTINSÄUREAMIDADENINDINUCLEOTID (PHOSPHAT) UND 3-ACETYLPYRIDIN AUF DIE CO_2-BILDUNG AUS U-^{14}C-GLUCOSE IM EPIDIDYMALEN FETTGEWEBE DER RATTE

D-Glucose 1 µmol/ml, 0,2µCi(U-^{14}C)-Glucose /5ml, 3h Inkubation.

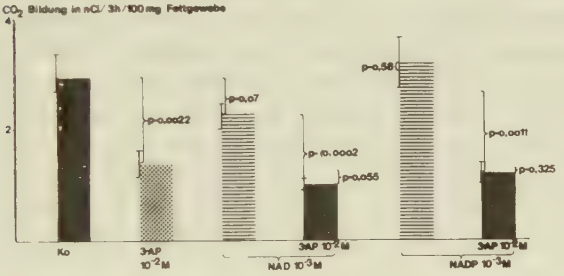
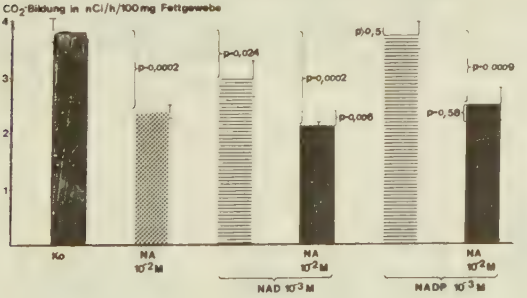


Abb. 13

Wirkung von Nikotinsäureamidadenindinucleotid(Phosphat) und Nikotinsäureamid auf die CO_2-Bildung aus U-^{14}C-Glucose im epididymalen Fettgewebe der Ratte

D-Glucose 1 µmol/ml Ansatz, 0,1 µCi [U-^{14}C]-Glucose/5 ml Ansatz, 3 h Inkubation.



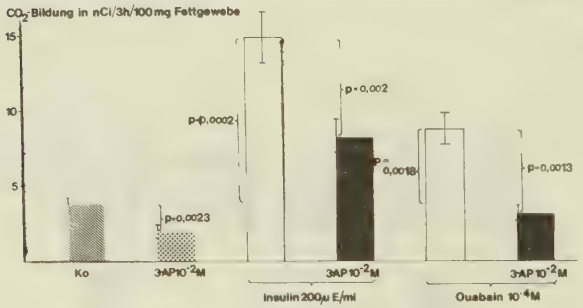
I - G Wirkung von Ouabain und 3-AP auf die $^{14}CO_2$-Bildung.

Der Zusatz von Ouabain zum glucosehaltigen Fettgewebsansatz führt wie Insulin zur Stimulierung der CO_2-Bildung (HO u. JEANRENAUD, 1967; HO, JEANRENAUD, POSTERNAK u. RENOLD, 1967). Diese durch Ouabain angeregte $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)-Glucose wird durch die gleichzeitige Gabe von 3-AP aufgehoben.

Wie Abb. 14 veranschaulicht, wird bei einer Konzentration von 10^{-4}M Ouabain eine über 100 %ige Stimulierung der $^{14}CO_2$-Bildung beobachtet ($p = 0{,}0018$). Bei der gleichzeitigen Anwesenheit von 3-Acetylpyridin (10^{-2}M) wird die $^{14}CO_2$-Bildung zu etwa 64 % gedrosselt ($p = 0{,}00125$).

Abb. 14

Wirkung von 3-Acetylpridin, Insulin und Ouabain auf die CO_2-Bildung aus [U-^{14}C]-Glucose im epididymalen Fettgewebe der Ratte 1 µmol/ml Ansatz-D-Glucose, 0,1 µCi[U-^{14}C]Glucose/5ml, 3h Inkubation

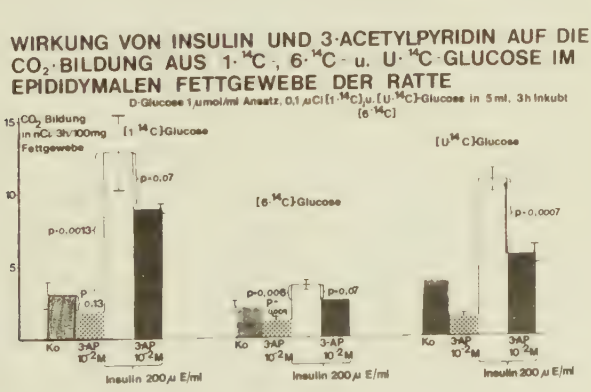


II - A $^{14}CO_2$-Bildung aus verschieden markierten Glucosen

Der auffallende Unterschied im Ausmass der 3-AP Hemmwirkung auf die $^{14}CO_2$-Bildung bei der Verwendung von (1-^{14}C)-Glucose und (U-^{14}C)-Glucose veranlasste den genaueren Vergleich verschieden markierter Zucker im gleichen Versuch. Es sollten damit auch gleichzeitig Aufschlüsse über die benutzten Stoffwechselwege erzielt werden.
Schon ohne Zusatz von Hemmstoffen oder Stimulantien werden am Fettgewebe Unterschiede in der Grösse der $^{14}CO_2$-Bildung aus (1-^{14}C)-, (6-^{14}C)- und (U-^{14}C) beobachtet, die bei insulinhaltigen Ansätzen noch deutlicher hervortreten (MILSTEIN,1956; WINEGRAD u. RENOLD, 1958; JEANRENAUD u. RENOLD, 1959). Insulin steigert die $^{14}CO_2$-Bildung bei Verwendung von (6-^{14}C)-Glucose nur um 60-80 %. (1-^{14}C) und (U-^{14}C) Glucose lassen hingegen Steigerungen um das 2 1/2 fache bis maximal 6 fache zu.

Die 3-AP Hemmwirkung auf diese verschieden markierten Glucosen erfolgt in unterschiedlichem Ausmass. Bei (U-^{14}C)-Glucose beträgt sie um 67 %, bei (1-^{14}C) um 40 % und bei (6-^{14}C) um 34 %. Ähnlich verhält sich die 3-AP Hemmwirkung auf die durch Insulin angeregte $^{14}CO_2$-Bildung, die bei (U-^{14}C) am stärksten ist und um ca. 60 %, bei (1-^{14}C)- ca. 32 % und bei (6-^{14}C) 25 % beträgt.

Abb. 15



Diese Ergebnisse lassen sich nur dadurch deuten, dass man andere über die Hemmung des Glucosetransportes hinausgehende Stoffwechselwirkungen annimmt.
Im Gegensatz zu 3-AP ruft 6-AN (ohne Insulin) bei Kurzzeit-Inkubation keine nennenswerte Hemmung der $^{14}CO_2$-Bildung hervor. Im Langzeitversuch (5 Std.) hemmt 6-AN die $^{14}CO_2$-Bildung nur geringfügig. Die durch Insulin stark angeregte $^{14}CO_2$-Bildung wird allerdings durch 6-AN sehr stark eingeschränkt, wobei die Hemmung bei (1-^{14}C) und (U-^{14}C) am ausgeprägtesten ist (v. BRUCHHAUSEN u. OFORI-NKANSAH, 1969).

II - B $^{14}CO_2$-Bildung aus Pyruvat

Zur Differenzierung zwischen Transportprozess und glykolytischem Endabbau der Glucose eignet sich Pyruvat, das zudem frei in die Fettgewebszelle permeieren kann. Die Grösse der $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)-Pyruvat weicht in Ansätzen, die Insulin und 6-AN enthalten, nicht nennenswert von der Kontrolle ab. Zusatz von 3-AP hingegen ruft eine deutliche Hemmung hervor, wie es aus der folgenden Tabelle zu entnehmen ist. Sie beträgt mit 3-AP (10^{-2}M) ca. 40 %.

Tabelle I

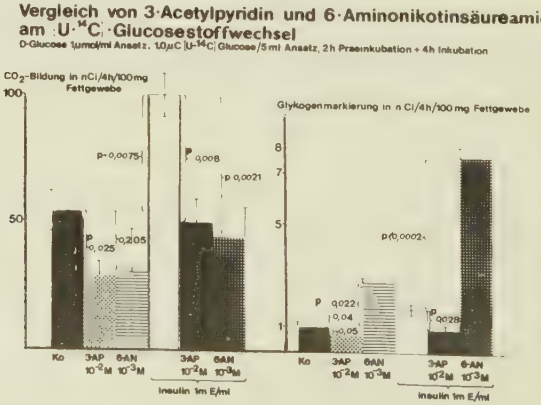
$^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)-Pyruvat in n Ci/3 Std./100 mg Fettgewebe.

	ohne Insulin	mit Insulin
Ko	18,4 ± 2,0	17,3 ± 1,5
6-AN	21,0 ± 1,2	20,3 ± 4,3
3-AP	10,6 ± 2,6	11,4 ± 0,9
	($p = 0{,}0042$) gegen Ko	($p > 0{,}0002$) gegen Ko

III Einfluss von 3-AP und 6-AN auf die Markierung des Fettgewebsglykogens aus (U-^{14}C)-Glucose.

Der verminderten Glucoseaufnahme entsprechend lässt sich erwarten, dass die radioaktive Markierung des Fettgewebsglykogens 3-AP-haltiger Ansätze bei Verwendung von radioaktiv markierter Glucose niedriger als bei den Kontrollansätzen liegt. Unter Zusatz von 3-AP (10^{-2}M) (Abb. 16) sinkt die Glykogenmarkierung durch (U-^{14}C)-Glucose um ca. 35 % (p= 0,05) ab. Parallel dazu erniedrigt sich die $^{14}CO_2$-Bildung derselben Ansätze ebenfalls um 50 % (p = 0,025) (vgl. I-A (Abb. 4)). Die Abbildung zeigt ausserdem, dass in Gegenwart von Insulin die Glykogenmarkierung des Fettgewebes um ca. 40 % (p = 0,028) und die $^{14}CO_2$-Bildung zu etwa 55 % (p = 0,008) durch 3-AP herabgesetzt werden.
Im gleichen Versuch verursacht 6-AN, wie in der Einleitung erwähnt, eine Steigerung der Glykogenmarkierung. Auch ohne Insulin erhöht 6-AN (10^{-3}M) die Markierung des Fettgewebsglykogens um 150 % (p = 0,022). Insulin allein steigert, wie bekannt, ebenfalls um ca. 70 %. (p = 0,04). Beim gleichzeitigen Zusatz von 6-AN und Insulin werden Werte erreicht, die die Kontrollansätze um 640 % (p = 0,0002) übertreffen. Der Effekt ist also mehr als additiv.

Abb. 16



IV Wirkung von 3-AP, 6-AN, 3-APAD und 6-ANAD auf einige glykolytische Enzyme.

Die in den Abschnitten I A, I B und II A beschriebenen Versuche mit verschieden markierten Glucosen haben gezeigt, dass über die Transporthemmung hinausgehende Wirkungen des 3-AP im Glucoseabbau anzunehmen sind. Zur Klärung der Frage, an welchen Stellen im Ablauf der Glykolyse Störungen eingetreten sein könnten, wurden einige enzymatische Schritte untersucht. Dabei standen folgende Gesichtspunkte im Vordergrund :

1) mögliche Beziehungen oder Rückwirkungen zum Transportsystem, wie sie z.B. von PARKER u. HOFFMAN, (1967) an Erythrozyten für die 3-Phosphoglyceratkinase postuliert wurden,
2) die Anfälligkeit der Glykolyse an enzymatischen Engpässen, d.h. an den sogenannten Schlüsselenzymen.

IV A Wirkung von 3-AP und 6-AN auf die 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität im Fettgewebshomogenat.

3-Phosphoglycerat-Kinase bewirkt in der Glykolyse die Umwandlung von 1,3-Diphosphoglycerat in 3-Phosphoglycerat.

$$\text{1,3-Diphosphoglycerat} + \text{ADP} \underset{}{\overset{\text{PGK} + Mg^{++}}{\rightleftharpoons}} \text{3-Phosphoglycerat} + \text{ATP}$$

Während 6-AN (10^{-3}M), wie es aus Tab. II hervorgeht, keinerlei Hemmung der Reaktion zeigt, schränkt 3-AP ($2 \cdot 10^{-2}$M) in Gegenwart von ATP ($1{,}2 - 10^{-3}$M) die Bildung von Dihydroxyacetonphosphat aus 1,3-Diphosphoglycerat, welches durch die Wirkung von 3-Phosphoglycerat-Kinase auf 3-Phosphoglycerat entsteht, zu ca. 15 % ein.
Der Hemmgrad des 3-AP auf die 3-Phosphoglycerat-Kinase erweist sich, wie Tab. III zeigt, als unabhängig vom Substrat 3 - Phosphoglycerat. Gegenüber ATP als Substrat nimmt der Hemmgrad mit abnehmenden Konzentrationen des Substrats zu. Mit ATP ($6{,}7 - 10^{-4}$M) beträgt die 3-AP-Hemmwirkung ca. 29 % und erreicht mit ATP ($6{,}7 \cdot 10^{-5}$M) ca. 42 % (Tab. IV). Im Sinne einer Lineweaver-Burk Darstellung kann dies als nicht kompetitive Hemmung gegenüber dem ATP gedeutet werden.

Tabelle II

Wirkung von 3-AP und 6-AN auf die 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität im Fettgewebshomogenat.

3-PG ($3{,}33 \cdot 10^{-3}$M) u. ATP ($1{,}2 \cdot 10^{-3}$M) waren in einem Ansatz von 3 ml Endvolumen enthalten.

Ansatz	Umsatz NADH in mμmol/min/g Fettgewebe	% Hemmung
Ko	57,3	
3-AP (2.10^{-2}M)	49,3	13,8
3-AP (10^{-2}M)	49,9	12,8
3-AP (2.10^{-3} M)	51,5	10,1
3-AP (10^{-3}M)	52,5	8,3
6-AN (10^{-3}M)	57,0	--,--

Tabelle III

Die Hemmwirkung von 3-AP auf die 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität im Fettgewebshomogenat mit 3-Phosphoglycerat als Substrat.

Der Ansatz (3 ml Endvolumen) enthielt ATP ($1{,}2 \cdot 10^{-3}$M)

3-Phosphoglycerat	Umsatz NADH in mμmol/min/g Fettgewebe ohne 3-AP	mit 3-AP (2.10^{-2}M)	% Hemmung
$3{,}33 \cdot 10^{-3}$M	45,3	39,7	12,0
$1{,}67 \cdot 10^{-3}$M	38,6	33,5	13,3
$6{,}7 \cdot 10^{-4}$M	25,8	22,7	12,0
$3{,}3 \cdot 10^{-4}$M	17,5	15,4	12,3
$6{,}7 \cdot 10^{-5}$M	10,8	9,3	14,2

Tabelle IV

Die Hemmwirkung von 3-AP auf die Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Kinase im Fettgewebshomogenat mit ATP als Substrat.

Der Ansatz (3ml Endvolumen) enthielt 3-PG ($3{,}33 \cdot 10^{-3}$M)

A T P	Umsatz NADH in mμmol/min/g Fettgewebe ohne 3-AP	mit 3-AP (2.10^{-2}M)	% Hemmung
$6{,}7 \cdot 10^{-4}$M	92,6	65,6	29,1
$3{,}3 \cdot 10^{-4}$M	77,4	53,4	31,0
$1{,}3 \cdot 10^{-4}$M	33,8	21,8	32,5
$6{,}7 \cdot 10^{-5}$M	14,2	8,3	41,5

Die Wirkung der entsprechenden Analogen lässt sich im vorliegenden System nicht messen, da eine NAD-abhängige Reaktion beteiligt ist. Es wird daher im folgenden Abschnitt die Reaktion in abgewandelter Form benutzt.

IV Aβ Wirkung der Nucleotide 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid (3-APAD) und 6-Aminonikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (6-ANAD) auf die Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Kinase im Fettgewebshomogenat.

Es wird die Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Kinase des Fettgewebes in Richtung der 1,3-Diphosphoglyceratbildung gemessen. Um die Wirksamkeit des Systems zu erfassen, wurden bei der Inkubation über verschiedene Zeiten im Vergleich zu Kontrollansätzen verschiedene Reagenzien ausgelassen.
Aus Tab. V geht hervor, dass weder 6-ANAD ($2 \cdot 10^{-4}$M) noch 3-APAD (10^{-3}M) im Vergleich zu Kontrollansätzen einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Kinase ausübt.

Tabelle V

Wirkung von 3-APAD und 6-ANAD auf die Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Kinase im Fettgewebshomogenat.
Der Ansatz (3 ml Endvolumen) enthielt 10 µmol 3-PG, 4 µmol ATP, 10 µmol $MgSO_4$ und 0,2 ml Fettgewebsextrakt.

Ansatz	Extinktion gemessen bei 492 mµ
Ko.	288 ± 8
mit 3-APAD (10^{-3}M)	252 ± 2
mit 6-ANAD ($2 \cdot 10^{-4}$M)	274 ± 16
ohne 3-PG	17,5 ± 1,3
ohne ATP	19,3 ± 0,8
ohne Fettgewebsextrakt	15,8 ± 1,1
ohne Hydroxylamin	15,3 ± 0,3

IV Bα Einfluss von 3-AP, 6-AN, 3-APAD und 6-ANAD auf die Aktivität der Phosphofructokinase des Fettgewebes.

Unter den Schlüsselenzymen, die die Glykolyse regulieren - Hexokinase, Phosphofructokinase, Aldolase und Pyruvatkinase (WEBER, BANERJEE u. ASHMORE, 1960; WEBER, HIRD, STAMM u. WAGLE, 1965; OREVI, GORIN u. SHAFRIR, 1969) - kommt der Phosphofructokinase besondere Bedeutung zu. Die Aktivität dieses Enzyms wirkt sich nicht nur auf den Fluss der Glucose in der Glykolyse aus, sondern auch auf den Durchsatz in Richtung Glykogen und durch den Pentose-Phosphat-Weg. Da unter der kombinierten Anwendung von Insulin und 6-AN eine mehr als additive Stimulierung der Markierung des Fettgewebsglykogens zu beobachten ist (Abschnitt III), wurde der Einfluss des 6-AN bzw. seines NAD-Analogen (6-ANAD) auf dieses Enzym - Phosphofructokinase - untersucht. Die Wirkung von 6-AN und 3-AP und ihren NAD-Analogen, 6-ANAD und 3-APAD auf die Pyruvatkinase wurden schon früher untersucht (v. BRUCHHAUSEN, 1964).
Die Wirkung auf die Aktivität der Phosphofructokinase soll Tab. VI verdeutlichen. Die Messung macht von einer mehrschrittigen Reaktionsfolge Gebrauch. Als Mass für die Umsatzgeschwindigkeit wurde die Reduktion von NAD (in mμmol/min/g Fettgewebe) verwendet. Der Zusatz von 6-ANAD (II.Wahl) führt zu einer Verlangsamung der gesamten Reaktion. In einer Konzentration von $1{,}5 \cdot 10^{-4}$M drückt sich diese in einer ca. 29 %igen Hemmung aus. Erhöhung der 6-ANAD-Konzentration hat eine starke Hemmung des Systems zur Folge : so wird bei einer 6-ANAD-Konzentration von $3 \cdot 10^{-4}$M eine ca. 66 %ige, bei $1{,}2 \cdot 10^{-3}$M eine völlige Hemmung beobachtet.
Im Gegensatz hierzu führen 6-AN (10^{-3}M), 3-AP (10^{-2}M) und 3-APAD (10^{-3}M) zu keinerlei Hemmung des Systems.

Tabelle VI

Hemmung der Phosphofructokinaseaktivität im Fettgewebshomogenat durch 6-ANAD

Der Ansatz von 3 ml Endvolumen enthielt 10 µmol FDP, 4 µmol ATP und 7,5 µmol $MgSO_4$

	Umsatz NAD in mµ mol/min/g Fettgewebe	% Hemmung
Ko. I	77,3 ± 0,7	
6-ANAD ($1{,}5 \cdot 10^{-4}$M)	54,6	29,4
6-ANAD ($3 \cdot 10^{-4}$M)	26,5	65,8
6-ANAD ($1{,}2 \cdot 10^{-3}$M)	0,0	100
Ko. II	45,5 ± 4,4	
3-AP (10^{-2}M)	41,8	
6-AN (10^{-3}M)	46,2	
Ko. III	66,0	
3-APAD (10^{-4}M)	69,0	
3-APAD ($5 \cdot 10^{-4}$M)	59,5	
3-APAD (10^{-3}M)	64,5	

IV B Wirkung von 6-ANAD auf die Aktivität der Phosphofructokinase des Kaninchenmuskels

Die Messung der Phosphofructokinase-Aktivität in umgekehrter Richtung - nämlich in Richtung des Fructose-6-phosphats- macht von der Reduktion von NADP Gebrauch. Am reinen Enzym aus Kaninchenmuskel ergeben sich die gleichen Befunde wie im Abschnitt IV B .

Werden alle drei angewandten Enzymschritte, nämlich die Phosphofructokinase-Reaktion, die Phosphoglucose-Isomerase-Reaktion und die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion kinetisch gemeinsam verfolgt, so zeigt sich ein deutlicher Hemmeffekt durch 6-ANAD ($2 - 10^{-4}$M) (1. Wahl), der rund 60 % beträgt. Durch den Zusatz von 6-AN (10^{-3}M), 3-AP (10^{-2}M) und 3-APAD (10^{-3}M) treten keine nennenswerten Hemmwirkungen an diesem System auf. 6-ANAD nimmt keinen Einfluss auf die enzymatischen Hilfsreaktionen. Wird nämlich die Phosphoglucose-Isomerase-Reaktion sowie die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion in Einzelschritten mit limitierenden Substratmengen, aber Enzym-Konzentrationen, die etwas über der Limitierung liegen, getestet, so ergibt sich keinerlei Hemmwirkung durch 6-ANAD ($2 . 10^{-4}$M) (Tab. VII). Abb. 17 spiegelt die Konzentrationsabhängigkeit der 6-ANAD Hemmwirkung auf die Phosphofructokinase wider. Durch Endkonzentrationen von mehr als 10^{-4}M wird die Enzymaktivität sehr stark eingeschränkt und bei höherer Konzentration praktisch aufgehoben. So wird bei einer 6-ANAD-Konzentration von 10^{-4}M (1. Wahl) eine rund 42 %ige Hemmung der Enzymaktivität beobachtet; bei einer 6-ANAD-Konzentration von $8 . 10^{-4}$M beträgt diese Hemmung rund 93 %. Es errechnet sich eine halbmaximale Hemmkonzentration von $1{,}57 . 10^{-4}$M.

Tabelle VII

Der Hemmeffekt von 6-ANAD auf die Aktivität der Phosphofructokinase (aus Kaninchenmuskel)

Enzymschritte	Zusätze (Konzentration)	NADP-Reduktion (in Mol 10^{-9}/min)	System	% Hemmung
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase		Glucose-6-phosphat 5 µmol/3 ml	Ansatz (3 ml Endvolumen) enthielt: 5 µmol G-6-P* 0,6 µmol NADP 2,5 µg G-6-PDH 0,1 M Tris-HCl pH 7,5	
	keine	11,9		
	6-ANAD (2.10^{-4} M)	11,8		
Phosphoglucose-Isomerase Glucose-6-phosphat Dehydrogenase		Fructose-6-phosphat 5 µmol/3 ml	Ansatz (3 ml Endvolumen) enthielt: 5 µmol F-6-P 0,6 µmol NADP 2,0 µg PGI 25 µg G-6-PDH alles in 0,1 M Tris-HCl pH 7,5	
	keine	7,1		
	6-ANAD (2.10^{-4} M)	7,6		
Phosphofructokinase Phosphoglucose-Isomerase Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase		Fructose-1,6-diphosphat 10 µmol/3 ml	Ansatz (3 ml Endvolumen) enthielt : 10 µmol FDP 0,6 µmol NADP 12 µmol ADP 10 µmol $MgSO_4$ 25 µg G-6-PDH 20 µg PGI 100 µg PFK alles in 0,1 M Tris-HCl pH 7,5	
	keine	3,0		
	6-ANAD (2.10^{-4} M)	1,2		60
	3-AP (10^{-2} M)	3,1		
	3-APAD (10^{-3} M)	3,3		
	6-AN (10^{-3} M)	2,9		

*Abkürzungen:
G-6-P = Glucose-6-phosphat
G-6-PDH = Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
F-6-P = Fructose-6-phosphat
PGI = Phosphoglucose-Isomerase
PFK = Phosphofructokinase
ADP = Adenosindiphosphat
FDP = Fructose-1,6-diphosphat

IV B Kinetische Analyse der Phosphofructokinase-Hemmung in Richtung des Fructose-6-phosphats

I Fructose-1,6-diphosphat als Substrat

In Abb. 18 wird die Hemmwirkung des 6-ANAD ($2 \cdot 10^{-4}$M) auf die Aktivität der Phosphofructokinase (aus Kaninchenmuskel) als Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt. Als variables, die Reaktionsgeschwindigkeit limitierendes Substrat diente Fructose-1,6-diphosphat. Aus dem Diagramm ist zu entnehmen, dass die Hemmung durch 6-ANAD offenbar nicht kompetitiv ist. Bei einer Michaelis-Konstante (K_m) von $1{,}54 \cdot 10^{-3}$M beträgt die maximale Geschwindigkeit (Vmax) für Kontrollansätze 10 mµmol/min und bei der Anwesenheit von 6-ANAD ($2 \cdot 10^{-4}$M) 4,8 mµmol/min.

II ADP als Substrat

Abb. 19 stellt die Hemmwirkung des 6-ANAD (10^{-4}M) auf die Aktivität der Phosphofructokinase (aus Kaninchenmuskel) als Lineweaver-Burk-Diagramm mit ADP als variablem, die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmendem Substrat dar. Es liegt hier ebenfalls eine nicht kompetitive Hemmung vor, wenn man sehr hohe Substratkonzentrationen unberücksichtigt lässt. Es beträgt dann bei einem K_m von $2 \cdot 10^{-4}$M das Vmax für Kontrollansätze 6,7 mµmol/min und für 6-ANAD (10^{-4}M) 2,2 mµmol/min. Wird die ADP-Konzentration von $6{,}67 \cdot 10^{-5}$M auf $6{,}67 \cdot 10^{-3}$M erhöht (Tab. VIII) so kommt es erwartungsgemäss bei Kontrollansätzen zu einer dreifachen Steigerung des NADP-Umsatzes, während es bei 6-ANAD (10^{-4}M) enthaltenden Ansätzen zu einer 6fachen Steigerung des NADP-Umsatzes führt, d.h. die durch 6-ANAD hervorgerufene Hemmung der Phosphofructokinaseaktivität wird durch zunehmende ADP-Konzentration geringer. Diese Unstetigkeit im Kurvenverlauf kann(s. Diskussion) mit der Aktivierung des Enzyms durch ADP-Konzentrationen bis zu 1 mM erklärt werden (DENTON u. RANDLE, 1966).

Abb. 1

Wirkung von verschiedenen 6-Aminonikotinsäure-amidadenindinucleotid-Konzentrationen auf die Aktivität der Phosphofructokinase aus Kaninchen-muskel

(Aktivität gemessen als Umsatz von NADP in mμmol/min)

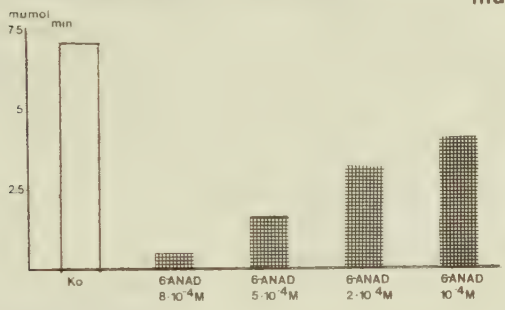


Tabelle VIII

Der Hemmeffekt von 6-ANAD auf die Aktivität der Phosphofructokinase mit ADP als Substrat

ADP Konzentration	NADP-Reduktion (in M 10^{-9}/min) ohne 6-ANAD	mit 6-ANAD (10^{-4}M)	% Hemmung
6,67 . 10^{-3}M	6,3,	3,6	44,8
3,33 . 10^{-3}M	6,1	2,8	54,1
6,67 . 10^{-4}M	4,6	1,7	63,0
3,33 . 10^{-4}M	4,1	1,3	65,8
1,67 . 10^{-4}M	3,3	1,0	69,7
6,7 . 10^{-5}M	2,2	0,6	72,9

Abb. 18

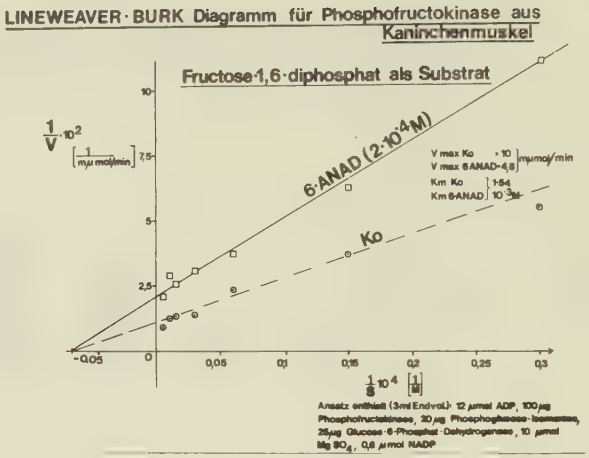
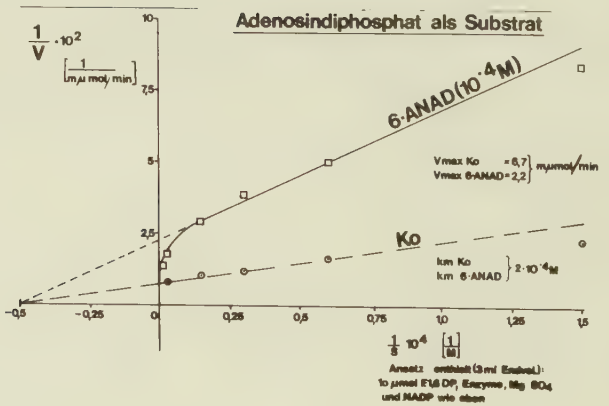

LINEWEAVER·BURK Diagramm für Phosphofructokinase aus Kaninchenmuskel
Fructose-1,6-diphosphat als Substrat
1/V ·10²
[1/mμ mol/min]
6-ANAD (2·10⁻⁴M)
Ko
V max Ko = 10
V max 6-ANAD = 4,8
mμmol/min
Km Ko
Km 6-ANAD
1·54
10⁻³M
1/S 10⁴ [1/M]
Ansatz enthielt (3ml Endvol.): 12 μmol ADP, 100 μg Phosphofructokinase, 20 μg Phosphoglucose-Isomerase, 25 μg Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 10 μmol Mg SO4, 0,8 μmol NADP

Abb. 19


Adenosindiphosphat als Substrat
1/V ·10²
[1/mμ mol/min]
6-ANAD (10⁻⁴M)
Vmax Ko = 6,7
Vmax 6-ANAD = 2,2
mμmol/min
Ko
km Ko
km 6-ANAD
2·10⁻⁴M
1/S 10⁴ [1/M]
Ansatz enthielt (3ml Endvol.): 10 μmol F1,6 DP, Enzyme, Mg SO4 und NADP wie oben

DISKUSSION

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung von 3-Acetylpyridin und 6-Aminonikotinsäureamid am Fettgewebe erhebliche Unterschiede aufweisen. Sehr deutlich zeigt sich dies bei der Glucoseaufnahme in das Fettgewebe.

Drei Vorgänge müssen durchlaufen werden, bis die zum Fettgewebsverband zugesetzte Glucose in der Zelle als Glucose-6-phosphat vorliegt, nämlich die Diffusion zur Fettgewebsmembran, d.h. in den extracellulären Raum, Transport der Glucose vom extra- in den intracellulären Raum und die intracelluläre Phosphorylierung der freien Glucose (CROFFORD u. RENOLD, 1965; RENOLD, CROFFORD, STAUFFACHER u. JEANRENAUD, 1965; DENTON, YORKE u. RANDLE, 1966). In diesem Gewebe (WINEGRAD u. RENOLD, 1958; JEANRENAUD u. RENOLD, 1959; FLATT u. BALL, 1964; CROFFORD u. RENOLD, 1965) sowie im Herzmuskel und Zwerchfell KIPNIS u. CORI, 1957, 1959; MORGAN, HENDERSON, REGEN u. PARK, 1961; PARK, MORGAN, HENDERSON, REGEN, CADENCAS u. POST, 1961; RANDLE u. MORGAN, 1962) ist der Glucosetransport in die Zelle der limitierende Faktor bei dem Gesamtvorgang, auf den Insulin stimulierend einwirkt. Kinetisch besteht die Wirkung des Insulins in der Steigerung der maximalen Transportgeschwindigkeit (Vmax) ohne Veränderung der Transportkonstante K_T (FROESCH u. GINSBERG, 1964; KUO, DILL u. HOLMLUND, 1967; CAYGILL u. STEIN, 1967). Dadurch wird die Glucoseaufnahme beschleunigt, ohne dass eine parallele Zunahme der Glucose-Phosphotransferase-Aktivität beobachtet wird (HERNANDEZ u. SOLS, 1963).

Die Glucoseaufnahme kann durch die Abnahme der Konzentration im Medium bestimmt werden, da wegen des Mangels an Glucose-6-Phosphatase (WEBER, BANERJEE u. ASHMORE, 1960; WEBER, HIRD, STAMM u. WAGLE, 1965) im Fettgewebe kein Rückstrom von Glucose ins Medium denkbar ist. Die $^{14}CO_2$-Bildung aus ^{14}C-markierten Zuckern (namentlich (1-^{14}C)-Glucose) ist dem Transportvorgang gleichzusetzen, da bis zur Abspaltung von CO_2 im oxydativen Teil des Pentose-Phosphat-Weges keine limitierenden Schritte vorliegen. Ebenso wie die Glucoseaufnahme wird die $^{14}CO_2$-Bildung aus ^{14}C-markierten Zuckern durch 3-AP allein sowie bei Anwesenheit von Insulin gehemmt. Im Vergleich zu 6-Aminonikotinsäureamid, das ebenfalls ein NA-Analoges ist und am Fettgewebe eine Hemmung der insulin-stimulierbaren

Reaktionen ausser der Glykogenmarkierung bewirkt (v. BRUCHHAUSEN u. HERKEN, 1966), erweist sich 3-AP am Fettgewebe als weniger wirksam. Die halbmaximale Hemmkonzentration bei 3-AP beträgt 7,2 . 10^{-3}M, während sie bei 6-AN um 0,3 . 10^{-5}M liegt (v. BRUCHHAUSEN u. HERKEN, 1966).

Die Bildung der abnormen Nucleotide als eigentliche Wirkform des 6-AN im Fettgewebe bedingt eine Latenzzeit von mindestens 2 Std. und erreicht ihr Maximum erst nach 6 Std. Die Wirkungen auf die insulinstimulierbare Glucoseaufnahme sowie die $^{14}CO_2$-Bildung am Fettgewebe werden daher durch die gleichzeitige Gabe von Nikotinsäureamid oder NAD verhindert (v. BRUCHHAUSEN u. HERKEN, 1966), da NA den Austausch gegen 6-AN durch die NAD-(P)-Glycohydrolase herabsetzt. Im Gegensatz hierzu besitzt der Wirkungseintritt von 3-AP keine messbare Latenzzeit, denn bereits 30 min nach Inkubationsbeginn ist die Hemmwirkung auf die $^{14}CO_2$-Bildung maximal erhöht und lässt sich über eine Inkubationsdauer von 3 Std. nicht mehr steigern. Ebenso führt die gleichzeitige Zugabe von Nikotinsäureamid bzw. NAD zu keiner Aufhebung des 3-AP-Hemmeffektes. NAD (10^{-3}M) und NA (3 . 10^{-3}M und 10^{-2}) wirken allerdings selbst hemmend auf die $^{14}CO_2$-Bildung. NADP (10^{-3}M) war hier unwirksam. Auf Grund dieser Beobachtungen kann geschlossen werden, dass diese Wirkungen des 3-AP am Fettgewebe im Gegensatz zu denen des 6-AN nicht an die Bildung der abnormen Nucleotide gebunden ist.

Die Glucoseaufnahme wird durch 3-AP gehemmt unabhängig davon, ob sie durch Insulin oder Ouabain stimuliert wird. Selbst hohe Konzentrationen von Insulin heben den 3-AP-Hemmeffekt nicht auf. Im Bereich sehr kleiner Insulin-Konzentrationen wird ebenfalls die Hemmung der $^{14}CO_2$-Bildung durch 3-AP beobachtet; die Hemmung erreicht Prozentsätze, die von denen bei mittleren Insulin-Konzentrationen nicht abweichen.

Ähnlich wie Insulin stimuliert Ouabain am Fettgewebe die Glucoseaufnahme, die $^{14}CO_2$-Bildung sowie die Glykogenmarkierung aus (^{14}C)-Glucose, hemmt aber die Glykogenolyse (HO u. JEANRENAUD, 1967) und die Lipolyse (HO, JEANRENAUD, POSTERNAK u. RENOLD, 1967). Dieser Effekt des Ouabains ist wahrscheinlich seiner antilipolytischen Eigenschaft zuzuschreiben. Am Fettgewebe hemmt Ouabain wie das antilipolytisch wirkende Insulin (JUNGAS u. BALL, 1963; RENOLD, CROFFORD, STAUFFACHER u.

JEANRENAUD, 1965) die Aktivität der Adenyl-Cyclase, ohne die Aktivität der Phosphodiesterase zu beeinflussen. Auch das Weglassen von K^+-Ionen im Aussenmedium setzt die Aktivität der Adenyl-Cyclase herab (HC, JEANRENAUD, POSTERNAK u. RENOLD, 1967). Dieses Enzym bewirkt eine vermehrte Bildung von 3', 5'-AMP (RALL u. SUTHERLAND, 1962). Ein Zusammenhang zwischen der Freisetzung von Fettsäuren und dem Glucosetransport ist beschrieben worden (RANDLE, GARLAND, HALES u. NEWSHOLME, 1963).

Die Unterschiede in der Wirkung von 6-AN und 3-AP werden ausserdem sehr deutlich, wenn man den weiteren Abbau der in die Fettzellen gelangten Glucose verfolgt. Die Verwendung verschieden markierter Glucosen erlaubt diesbezüglich gewisse Aufschlüsse. Schon ohne Zusatz von Insulin werden unter 3-AP bei Verwendung verschieden markierter Glucosen Unterschiede im Ausmass der $^{14}CO_2$-Bildung beobachtet. 6-AN hingegen zeigt ohne Insulin keine nennenswerten Unterschiede. Es ist bisher nicht bekannt, dass die verschieden markierten Glucosen -(1-^{14}C)-(6-^{14}C)- und(U-^{14}C)- unterschiedlich transportiert werden, auch nicht bei Anwesenheit von Insulin. Unterschiede in der Grösse der $^{14}CO_2$-Bildung müssten daher im Abbau gesucht werden, d.h. in der Glykolyse bzw. im Pentose-Phosphat-Weg. Das Fettgewebe besitzt einen sehr gut ausgestatteten Pentose-Phosphat-Weg (FLATT u. BALL, 1964) neben einem funktionstüchtigen glykolytischen EMDEN-MEYERHOF-Stoffwechselweg (WINEGRAD u. RENOLD, 1958). In Gegenwart von Insulin durchläuft die Glucose zu etwa 25 % den oxydativen Teil des Pentose-Phosphat-Weges und zu 75 % den glykolytischen Abbauweg (FLATT u. BALL, 1964; WEBER et al., 1965). Decarboxylierungen von (1-^{14}C)-,(6-^{14}C)und (U-^{14}C)- Glucose können über die Glykolyse (durch die Pyruvat-Decarboxylase-Reaktion), den Pentose-Phosphat-Weg (durch die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Reaktion) sowie im Tricarbonsäure-Cyclus nach KREBS erfolgen. Dabei entsteht Kohlendioxyd, das je nach der Anordnung der ^{14}C-Atome eine Radiomarkierung zeigt. Das im ersten Ablauf des Pentose-Phosphat-Weges durch oxyative Decarboxylierung entstandene Kohlendioxyd ist bei (1-^{14}C)und(U-^{14}C)- Glucose markiert, bei (6-^{14}C) unmarkiert. Nach dieser oxydativen Decarboxylierung bleibt im Ribuloseanteil die Markierung folglich nur noch bei (6-^{14}C) und (U-^{14}C)- Glucose erhalten. Durch die spätere Randomisierung der C-Atome über den Pentose-

Phosphat-Weg und die Glykolyse wird die Markierung der C-Atome unregelmässig verteilt.

Dass 6-AN und 3-AP beim Abbau der Glucose in der Fettzelle unterschiedliche Wirkung aufweisen, zeigt der Einfluss dieser NA-Analogen auf die Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Kinase und die $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)- Pyruvat. Während 3-AP die Aktivität dieses Enzyms -3-Phosphoglycerat-Kinase- und die $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)- Pyruvat hemmt, hat 6-AN auf beide Reaktionen keinen Einfluss. Die 3-Phosphoglycerat-Kinase katalysiert die Umwandlung von 1, 3-Diphosphoglycerat in 3-Phosphoglycerat. Dabei entsteht ein Molekül ATP, das als Energielieferant für die energiefordernden Prozesse der Zelle, wie die Glucoseaufnahme und Elektrolyttransporte dienen kann, wie dies an Erythrozyten gezeigt werden konnte (PARKER u. HOFFMAN, 1967). Falls der von diesen Autoren an Erythrozyten erhobene Befund auch für die Fettzelle gilt, könnte die durch 3-AP herabgesetzte Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Kinase den Glucosetransport beeinträchtigen, vorausgesetzt, dass der Substratumsatz in der intakten Zelle im gleichen Masse vermindert ist wie im Homogenat.

Pyruvat stellt das Endprodukt des nicht oxydativen Abbaus der Glucose dar und nimmt gleichzeitig eine Schlüsselstellung im Stoffwechsel der Kohlenhydrate, Fette und Eiweisse ein, da es über Acetyl-Co-A, Oxalacetat bzw. Malat metabolisiert werden kann. Da die Incorporation von (1-^{14}C)- Leucin in das Fettgewebsprotein und die Lipidsynthese aus (1-^{14}C) - Glucose (KAISER, 1968) sowie die Lipolyse isolierter Fettzellen (STREUBEL, 1968) durch 3-AP nicht beeinflusst werden, käme für die Hemmung der $^{14}CO_2$-Bildung eine erschwerte oxydative Verwertung des Pyruvats in Frage. Es wäre dabei an die oxydative Decarboxylierung des Pyruvats in dem Tricarbonsäure-Cyclus zu denken. Eine solche Störung würde zwangsläufig zur Verminderung der $^{14}CO_2$-Bildung führen.

Am ganzen Tier sind Hyperglykämien nach 3-Acetylpyridin (SCHREIBER, FISCHER, u. KMENTOVA, 1962; de la MORA, TAPIA u. MASSIEU, 1968) und nach 6-AN (v. BRUCHHAUSEN, 1965) beobachtet worden. Sie hängen von der Freisetzung von Katecholaminen ab, da sie nach Adrenalektomie stark eingeschränkt

sind (SEIFT, LOSERT u. SCHACHT, 1965; de la MORA et al.,1968). Die bei 3-AP-Gabe von SCHREIBER, FISCHER u. KMENTOVA (1962) beschriebene anfängliche Hypoglykämie konnte von COPER nicht bestätigt werden. Nach Gabe von sehr hohen Dosen von 3-AP fanden de la MORA et al. (1968) parallel zu der Hyperglykämie eine Verarmung des Leber- und Muskelglykogens, die durch die Aktivierung der Phosphorylase b in Phosphorylase a durch die Katecholamine erklärt werden kann. Die glykogenolytische Wirkung von endogenem oder appliziertem Adrenalin wird auf die Aktivierung der Membran-Adenyl-Cyclase mit nachfolgender vermehrter Bildung von 3', 5'-AMP in der Leber und Muskulatur zurückgeführt (SUTHERLAND u. RALL, 1960). In der Leber aktiviert 3', 5'-AMP seinerseits die Dephospho-Phosphorylase-Kinase, während die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase unbeeinflusst bleibt (RILEY, 1963) so dass sich die aktive Form der Phosphorylase vermehrt, die die Spaltung des Glykogens in Glucose -1-phosphat bewirkt (SUTHERLAND u. CORI, 1951). Die Leistungsfähigkeit dieses Systems im tierischen Organismus ist nach der Injektion von 6-AN offenbar nicht eingeschränkt (SCHACHT, 1965). Die Aktivität der Phosphorylase-b-Kinase des Muskels wird in vitro durch 6-ANAD ($3 \cdot 10^{-4}$M) um 50 % verringert. Dieser Befund wird dadurch unterstützt, dass die in vivo-Gabe von 100 mg/kg 6-AN an Ratten die aktive Form der Leberphosphorylase signifikant absinken lässt (v. BRUCHHAUSEN, 1964). Hingegen scheinen 6 Std nach der gleichen Dosierung die erforderlichen Hemmkonzentrationen zum Abfall der aktiven Form der Phosphorylase im Gehirn und Muskel nicht auszureichen (SCHACHT, 1965).

Die Hemmung der Glykogenmarkierung durch 3-AP und ihre Stimulierung durch 6-AN (v. BRUCHHAUSEN u. HERKEN, 1966) stellt weiterhin einen wesentlichen Unterschied in der Wirkungsweise dieser beiden Analogen dar. Ausgangssubstrat der Glykogensynthese ist das Glucose-6-phosphat (LELOIR u. CARDINI, 1957; LELOIR, OLAVARRÍA, GOLDEMBERG u. CARMINATTI, 1959), das in Glucose-1-phosphat übergeht (HUE u. HERS, 1969). Hohe Konzentrationen von Glucose-6-phosphat wie auch von Insulin VILLAR-PALASI u. LARNER, 1961) bewirken eine Aktivierung der UDPGα1,4-glucanα-4-Glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) = Glycogensynthetase (LELOIR, OLAVARRÍA, GOLDEMBERG u. CARMINATTI, 1959; LELOIR u. GOLDEMBERG, 1960 ; VILLAR-PALASI u. LARNER, 1960). Ob der Aufbau des Glykogens in allen Fällen über

Glucose-6-phosphat und Glucose-1-phosphat erfolgt, wird in jüngster Zeit angezweifelt (LANDAU u. SIMS, 1967; ANTONY, SRINIVASAN, WILLIAMS u. LANDAU, 1969).

Die Hemmung der Glykogenmarkierung durch 3-AP am Fettgewebe könnte durch eine Herabsetzung der Glucoseaufnahme, die sich in der $^{14}CO_2$-Bildung widerspiegelt, bedingt sein. Bei vermindertem Glucosetransport käme es zwangsläufig zu geringeren intracellulären Konzentrationen von Glucose-6-phosphat, Fructose-6 phosphat etc. Der Mangel an Glucose-6-phosphat hat eine geringere Glykogenmarkierung zur Folge, da durch Glucose-6-phosphat die inaktive Form der UDPG-Glykogen-Transglucosylase in die aktive Form überführt wird (VILLAR-PALASI u. LARNER, 1960). Daher ist eine Hemmung der am Glykogenaufbau beteiligten enzymatischen Prozesse wahrscheinlicher als eine Stimulation seines Abbaus. Dies steht im Einklang mit der Verarmung des Leber- und Muskelglykogens nach Gabe von sehr hohen 3-AP-Dosen (de la MORA et al., 1968).

Der starke in vitro-Anstieg der Glykogenmarkierung des Fettgewebes unter 6-AN tritt ein, obwohl gleichzeitig die Glucoseaufnahme herabgesetzt ist. Es müssen also andere Mechanismen an diesem Vorgang beteiligt sein. Naheliegende Befunde in vivo geben keine befriedigende Erklärung. Frühere Untersuchungen (v. BRUCHHAUSEN, 1964) haben nämlich einen Wiederanstieg der Glykogenmengen der Leber in der Hungerphase in vivo ergeben, allerdings erst im Zeitraum von 16 Std nach der 6-AN-Gabe. Dieser Befund konnte von v. HERRATH (1968) bestätigt werden und wird vermutlich zentral durch Reizung des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems hervorgerufen, die eine gesteigerte Ausschüttung von Glucocorticoiden hervorruft, damit die Gluconeogenese verstärkt und dadurch den Glykogengehalt der Leber erhöht. Da es bekannt ist, dass im Fettgewebe durch Mangel an Glucose-6-Phosphatase und Fructose-1, 6-Diphosphatase (WEBER, BANERJEE u. ASHMORE, 1960; WEBER, HIRD, STAMM u. WAGLE, 1965) sowie Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (WAGLE u. ASHMORE, 1964) die Gluconeogenese nicht abläuft, und auch mit markierten Pyruvat keine nennenswerte Markierung des Fettgewebsglykogens stattfindet (CHRISTOPHE, JEANRENAUD, MAYER u. RENOLD, 1961;

WHITE, WILLIAMS u. LANDAU, 1968), was in eigenen Versuchen bestätigt werden konnte, scheidet diese Erklärungsmöglichkeit am Fettgewebe aus.

Hingegen könnte ein regulierender Schritt im Bereich der Glykolyse den Glykogenaufbau stark beeinflussen. Die intracelluläre Konzentration von Glucose-6-phosphat hängt nämlich stark von der Aktivität der Phosphofructokinase ab. In vitro liess sich die Aktivität dieses Enzyms aus Kaninchenmuskel sowie aus Fettgewebe durch 6-ANAD hemmen. Der Hemmtyp verhält sich, wenn man sehr hohe ADP-Konzentrationen unberücksichtigt lässt, dem ADP und Fructose-1,6-diphosphat gegenüber nicht kompetitiv. Die Unstetigkeit im Kurvenverlauf mit ADP als Substrat könnte folgendermassen gedeutet werden : Wegen des allosterischen Charakters des Enzyms könnte ADP einmal als Substrat, zum anderen Mal als Aktivator der Phosphofructokinase dienen. Die Aktivierung gelingt ebenfalls mit 3', 5'-AMP, 5'-AMP, AMP, anorganischem Phosphat und Sulfationen (LARDY u. PARK, 1959; PASSONEAU u. LOWRY, 1964; UNDERWOOD u. NEWSHOLME, 1965; DENTON u. RANDLE, 1966) sowie Serotonin (MANSOUR u. MANSOUR, 1962). Als Aktivator würde ADP mit dem Inhibitor (6-ANAD) konkurrieren und ihn von der Bindungsstelle verdrängen. Der zugrundeliegende Mechanismus wäre dann kompetitiv und wäre, wie aus den Ergebnissen hervorgeht, erst mit hohen ADP-Konzentrationen (über $6{,}67 \cdot 10^{-4}$ M) zu erreichen. Der Mechanismus der 6-ANAD-Hemmwirkung auf die Phosphofructokinase ist noch ungeklärt. Möglicherweise verwandelt 6-ANAD die aktive Form des Enzyms in die relativ inaktive Form durch Dephosphorylierung. Ebenso gut kann eine andersartige Reaktion an diesem Enzym stattfinden, das reaktionsfähige und für die Funktion wichtige Sulfhydrylgruppen (-SH-Gruppen) enthält (PAETKAU u. LARDY, 1967; KEMP u. FOREST, 1968; HOFER u. PETTE, 1968; YOUNATHAN, PAETKAU u. LARDY, 1968). In den vorliegenden in vitro-Systemen kann aber der von ZESCH (1968) erhobene Befund keine Erklärung abgeben. Dieser Autor fand 6 Std nach der intraperitonealen Injektion von 50 mg/kg 6-AN an Ratten eine ca. 40 %ige Verminderung der Konzentration an reduziertem Glutathion in der Niere, die auf eine verringerte Aktivität der Glutathionsreduktase ($NADPH_2$: Glutathion Oxydoreduktase,

(E.C. 1.6.4.2.) durch gebildetes 6-ANADP zurückgeführt wurde. Die Phosphofructokinase ist ein limitierendes Enzym am Anfangsteil der Glykolyse (CORI, 1942; ENGELHARDT u. SAKOV, 1943; NEWSHOLME u. RANDLE, 1961; PASSONEAU u. LOWRY, 1962, 1964). Im Skelett- und Herzmuskel (MANSOUR, 1963; MANSOUR, WAKID u. SPROUSE, 1965), in der Hefe (VIÑUELA, SALAS, SALAS u. SOLS, 1964), im Fettgewebe (DENTON u. RANDLE, 1966) sowie in Fasciola hepatica (STONE u. MANSOUR, 1967) existiert dieses allosterische Enzym in zwei interkonvertierbaren aktiven und inaktiven Formen. In aktiver Form bestimmt es die Grösse der Glykolyserate,es kommt zur Abnahme der Konzentrationen an Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat und ATP (LYNEN, 1963; MANSOUR, 1963) und Zunahme an Fructose-1,6-diphosphat (CORI, 1942; MANSOUR, 1963). Die Hemmung der Aktivität des Enzyms, wie sie durch ATP (LARDY u. PARK, 1959; MANSOUR u. MANSOUR, 1962; PARMEGGIANI u.BOWMAN, 1963; VIÑUELA, SALAS u. SOLS, 1963; DENTON u. RANDLE, 1966), Citrat (PASSONEAU u. LOWRY, 1963; PARMEGGIANI u.BOWMAN, 1963; UNDERWOOD u. NEWSHOLME, 1964; DENTON u. RANDLE, 1966; DENTON u. POGSON, 1966) sowie aerobe Bedingungen (AISENBERG u. POTTER, 1957; PASSONEAU u. LOWRY, 1962) bewirkt wird, führt zur Verminderung der Konzentrationen an Fructose-1,6-diphosphat und den folgenden Zwischenprodukten der Glykolyse. Im Homogenat des mit 6-AN präinkubierten Fettgewebes liess sich allerdings kein Anstieg der Intermediärprodukte - Glucose -6-phosphat, Fructose-6-phosphat und 6-Phosphogluconat - feststellen (v. BRUCHHAUSEN u. OFORI-NKANSAH, 1969).

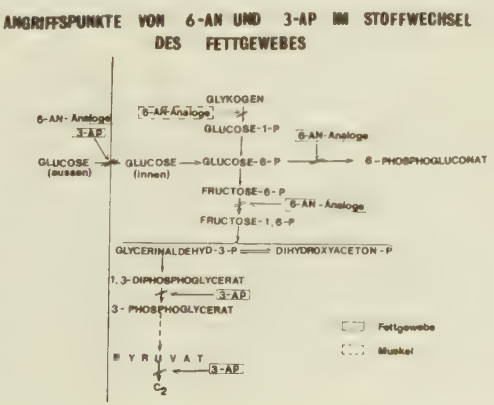
Durch die Arbeiten von KREBS et al.(1965) und PARMEGGIANI u. KREBS (1965) ist gezeigt worden, dass die Aktivität der Phosphofructokinase und der Phosphorylase-b-Kinase parallel laufen. Da die beiden Enzyme unter den gleichen physiologischen Bedingungen, Anoxie und Muskelkontraktion, aktivierbar, durch ATP hemmbar sind, scheint ein Synergismus in ihrer Wirkungsweise vorzuliegen. Durch 6-ANAD werden beide Enzyme gehemmt, das durch die Hemmung der Phosphofructokinase bedingte verbesserte Substratangebot könnte eine Stimulierung der Glykogenmarkierung bewirken. Durch Hemmung der Phosphorylase-b-Kinase wird die Glykogenolyse gehemmt. Der Aufbau des Glykogens wird stimuliert, gleichzeitig wird sein Abbau gehemmt, folglich tritt Glykogen vermehrt auf. Unterstützend bei diesen Vorgängen wirkt sich eine Hemmung der Aktivität der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase aus, die zuerst von

HERKEN, LANGE u. KOLBE (1969) im Gehirn mit 6-AN behandelter Ratten beobachtet wurde und später im Fettgewebe (v. BRUCHHAUSEN, 1969) bestätigt wurde, wenn das Gewebe von mit 6-AN behandelten Ratten mit Glucose inkubiert wurde. Vermehrt entstandenes 6-Phosphogluconat ist dann in der Lage, die Aktivität der Phosphoglucose-Isomerase zu hemmen (PARR, 1956,1957).

Mit der Hemmung der Phosphofructokinase durch 6-ANAD erweitert sich der Kreis der durch dieses Analoge hemmbaren Phosphokinasen (Phosphofructokinase, E.C. 2.7.1.11, Phosphorylase-b-Kinase, E.C. 2.7.1.38, Pyruvatkinase, E.C.27. 1.40 und Kreatininphosphokinase, E.C. 2.7.3.2), während sich andere Phosphokinasen mit Konzentrationen von 10^{-3}M nicht beeinflussen lassen (Hexokinase, E.C. 2.7.1.1, Uridinkinase, E.C. 2.7.1.48, Acetatkinase, E.C. 2.7.2.1, 3-Phosphoglycerat-Kinase, E.C. 2.7.2.3 und Phosphoglucomutase, E.C. 2.7.5.1).

Somit lassen sich die Wirkungen des 3-Acetylpyridins am Fettgewebe in vitro als mehr oder minder starke Hemmung der Glucoseaufnahme, der Dephosphorylierung des 1,3-Diphosphoglycerats in 3-Phosphoglycerat und der Decarboxylierung des Pyruvats darstellen. Demgegenüber stehen bei 6-AN die Hemmungen der insulinstimulierbaren Glucoseaufnahme, der Phosphorylierung des Fructose-6-phosphats in Fructose-1,6-diphosphat, der Umwandlung von Glucose-6-phosphat in 6-Phosphogluconat und die Erhöhung der Markierung des Fettgewebsglykogens im Vordergrund.

Abb. 20



ZUSAMMENFASSUNG

Es werden die Wirkungen des 3-Acetylpyridins und 6-Aminonikotinsäureamids auf den Glucosestoffwechsel des isolierten epididymalen Fettgewebes der Ratte verglichen.
Beide Substanzen (Nikotinsäureamid-Analoge) hemmen die insulinstimulierbare Glucoseaufnahme bzw. $^{14}CO_2$-Bildung aus(1-^{14}C-) und(U-^{14})- Glucose. Ebenfalls ist die durch Ouabain angeregte $^{14}CO_2$-Bildung durch 3-Acetylpyridin hemmbar. 3-Acetylpyridin ist im Gegensatz zu 6-Aminonikotinsäureamid auch ohne Insulin wirksam.
Der Zusatz von Nikotinsäureamid bzw. NAD(P) zu 3-Acetylpyridinhaltigen Fettgewebsansätzen hebt die hemmende Wirkung von 3-Acetylpyridin nicht auf. Nikotinsäureamid und NAD wirken selber in hohen Konzentrationen hemmend auf die $^{14}CO_2$-Bildung; NADP hat diesbezüglich keinen Einfluss. Die Wirkung des 3-Acetylpyridins ist schwächer - die halbmaximale Hemmkonzentration beträgt 7,2 . 10^{-3}M (bei 6-Aminonikotinsäureamid 0,3 . 10^{-5}M) - und tritt eher auf - maximal nach 30 Minuten - als die des 6-Aminonikotinsäureamids. Daraus ist zu schliessen, dass die Wirkung des 3-Acetylpyridins nicht an die Bildung abnormer Nucleotide gebunden ist. Im Gegensatz zu 6-Aminonikotinsäureamid hemmt 3-Acetylpyridin die $^{14}CO_2$-Bildung aus(U-^{14}C)- Pyruvat.

Ebenso wie die $^{14}CO_2$-Bildung wird die Markierung des Fettgewebsglykogens durch 3-Acetylpyridin vermindert, durch 6-Aminonikotinsäureamid erhöht. Die durch Insulin stimulierte Markierung des Fettgewebsglykogens ist ebenfalls durch 3-Acetylpyridin hemmbar, durch 6-Aminonikotinsäureamid mehr als additiv stimulierbar.
Die Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Kinase des Fettgewebes wird durch 3-Acetylpyridin herabgesetzt. Die Hemmung nimmt bei abnehmenden ATP-Konzentrationen zu. 3-Acetylpyridin - Adenin - Dinucleotid (3-APAD), 6-Aminonikotinsäureamid und 6-Aminonikotinsäureamid - Adenin - Dinucleotid (6-ANAD) haben keinen Einfluss auf die Aktivität dieses Enzyms.
Die Aktivität der Phosphofructokinase des Fettgewebes sowie eines gereinigten Präparates aus Kaninchenmuskel lässt sich durch 6-Aminonikotinsäureamid - Adenin - Dinucleotid konzentrationsabhängig hemmen. Die Hemmung erweist sich gegenüber

Fructose-1,6-diphosphat und ADP als Substrat, wenn man von sehr hohen ADP-Konzentrationen absieht, als nicht kompetitiv.

Mit der Hemmung der Phosphofructokinase durch 6-Aminonikotinsäureamid - Adenin - Dinucleotid ist ein verbessertes Substratangebot an Glucose-6-phosphat bzw. Fructose-6-phosphat zu erwarten, das eine Stimulierung am Glykogenaufbau beteiligten Enzyms - UDPG-glykogen-synthetase zur Folge haben kann. Damit kann die Stimulierung der Markierung des Fettgewebsglykogens durch 6-Aminonikotinsäureamid beim Angebot von ^{14}C-Glucose erklärt werden.

LITERATUR :

AISENBERG, A.C., u. V.R.POTTER: Studies on the Pasteur Effect. II. Specific Mechanisms. J. biol.Chem. 224, 1115 (1957)

ANDERSON, B.M.: Properties of 3-substituted pyridine analogues of DPN. Fed.Proc. 17, 181 (1958)

ANTONY, G.J., I. SRINIVASAN, H.R.WILLIAMS u. B.R.LANDAU: Studies on the existence of a pathway in liver and muscle for the conversion of glucose into glycogen without glucose 6-phosphate as an intermediate. Biochem. J. 111 , 453 (1969)

ATKINSON, D.E. u. G.M. WALTON: Kinetics of regulatory enzymes: Escherichia coli phosphofructokinase. J. biol. Chem. 240, 757 (1965)

ATKINSON, D.E., J.A.HATHAWAY u. E.C. SMITH: Kinetics of regulatory enzymes: Effectors of yeast phosphofructokinase do not alter the apparent kinetic order of the reaction. Biochem. biophys. Res. Comm. 18, 1 (1965)

AXELROD, B., u. R.S. BANDURSKI: Phosphoglycerylkinase in higher plants. J.biol. Chem. 204, 939 (1953)

BALL, E.G., D.B. MARTIN u. O.COOPER: Studies on the metabolism of adipose tissue. I. The effect of insulin on glucose utilization as measured by the manometric determination of carbon dioxide output. J.biol. Chem. 234, 774 (1959)

BESSMAN, S.P.: Molecular basis for the mechanism of insulin action. Amer. J.Med. 40, 740 (1966)

BISHOP, J.S., u. J.LARNER: Rapid activation of liver uridine diphosphate glucose-glycogen transferase and phosphorylase by insulin and glucagon in vivo. J. biol. Chem. 242, 1354 (1967)

BONSIGNORE, A., A.de FLORA, M.A. MANGIAROTTI, J.LORENZONI u. S. ALEMA: A new hepatic protein inactivating glucose-6-phosphate dehydrogenase. Biochem. J. 106, 147 (1968)

v.BRUCHHAUSEN, F.: Hemmung von Phosphokinasen durch 6-Aminonicotinamid-Analoge (6-ANAD) des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotids(NAD). Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 247, 87 (1964) a)

v. BRUCHHAUSEN, F.: Über die in vitro-Hemmung der Phosphorylase-Aktivierungsreaktion (Phosphorylase-Kinasereaktion) durch 6-Aminonicotinamid-Adenin-Dinucleotid (6-ANAD). Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 247, 376 (1964) b)

v.BRUCHHAUSEN, F.: Zum Mechanismus der Hyperglykämie bei der 6-Aminonicotinamid-Vergiftung der Ratte. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak.250, 241 (1965)

v.BRUCHHAUSEN, F., u. H.HERKEN: Wirkung des 6-Aminonicotinsäureamids auf die Insulin-abhängige Glucoseaufnahme in das epididymale Fettgewebe.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path, 254, 376 (1966)

v.BRUCHHAUSEN, F., I.KAISER u. H.HERKEN: Über Wirkungen von N-Amidino-3,5-diamino-6-chloro-pyrazin-carboxamid (Amilorid) auf den Glucosetransport und Leucineinbau in Proteine des epididymalen Fettgewebes der Ratte.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path. 262, 139 (1969)

v.BRUCHHAUSEN, F., u. N.OFORI-NKANSAH: Untersuchungen zur Wirkung des 6-Aminonicotinamids im Glucosestoffwechsel des Fettgewebes.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp.Path. 264, 223 (1969)

v.BRUCHHAUSEN, F.:Persönliche Mitteilungen (1969)

BRUNNEMANN, A., H.COPER u. H.HERKEN: Isolierung von 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid (3-APaD) aus dem Gehirn 3-Acetylpyridin-vergifteter Ratten.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. Pharmak. 244, 223 (1962)

BRUNNEMANN, A., H.COPER u. H.HERKEN: Biosynthese von 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (3-APADP) aus Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP).
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 245, 541 (1963)

BRUNNEMANN, A., u. H.COPER: Pharmakologische und biochemische Eigenschaften des 6-Aminonicotinamids.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 246, 63 (1963)

BRUNNEMANN, A., u. H.COPER: Die Aktivität NAD- und NADP-abhängiger Enzyme in verschiedenen Teilen des Rattengehirns.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 246, 493 (1964)

BRUNNEMANN, A., H.COPER u. D.NEUBERT: Biosynthese und Wirkung des 6-Aminonicotinamidadenindinucleotids (6-ANAD).
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 246, 437 (1964)

BUEDING, E., K.NAIM u. J. FISCHER: Tissue specificity of glycogen phosphorylase b of intestinal smooth muscle. J. biol. Chem. 239, 2099 (1964)

BUTCHER, R.W., u. E.W. SUTHERLAND: Adenosine 3', 5' phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3', 5' nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3' 5' phosphate in human urine.
J. biol. Chem. 237, 1244 (1962)

CAHILL, G.F., B.LEBOEUF, u. A.E.RENOLD: Studies on rat adipose tissue in vitro. III. Synthesis of glycogen and glyceride glycerol.
J.biol.Chem. 234, 2540 (1959)

CAYGILL, C.P.J., u. W.D. STEIN: Glucose uptake by isolated fat cells and the influence of insulin.
Biochem. J. 105, 17P (1967)

CHRISTOPHE, J.B., B. JEANRENAUD, J. MAYER u. A.E.RENOLD: Metabolism in vitro of adipose tissue in obese-hyperglycemic and goldthioglucosetreated mice. II. Metabolism of pyruvate and acetate.
J.biol.Chem. 236, 648 (1961)

CIACCIO, E.J.: The inhibition of lactate dehydrogenase by 3-acetylpyridine adenine dinucleotide and bisulfite.
J.biol.Chem. 241, 1581 (1966)

COGGESHALL, R.E., u. P.D. McLEAN: Hippocampal lesions following administration of 3-acetylpyridine.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 96, 667 (1958)

COPER, H.: Persönliche Mitteilungen (1965)

COPER, H., u. H.HERKEN: Schädigung des Zentralnervensystems durch Antimetaboliten des Nikotinamids.
Dtsch.med.Wschr. 88, 2025 (1963)

COPER, H., u. D.NEUBERT: Reaktionsgeschwindigkeit NADP-abhängiger Oxydoreduktasen aus Rattengehirn mit 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat.
J.Neurochem. 10, 513 (1963)

COPER, H., u. D.NEUBERT: Effect of 6-aminonicotinamide-adenine-dinucleotides and other NAD-analogues on the formation of NAD-P and its transphosphorylation to ATP.
Biochem. Biophys. Acta 82, 167 (1964)

COPER, H., u. D.NEUBERT: Einfluss von NADP-Analogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit einiger NADP-bedürftiger Oxydoreduktasen.
Biochem.Biophys.Acta 89, 23 (1964)

CORI, C.F. : Phosphorylation of carbohydrates. A Symposion on Respiratory Enzymes. Univ.of Wisconsin Press, Madison, (1942), p. 175

CROFFORD, O.B., u. A.E.RENOLD: Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue. Rate limiting steps and site of insulin action.
J.biol.Chem. 240, 14 (1965 a)

CROFFORD, O.B., u. A.E.RENOLD: Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue. Characteristics of the glucose transport system and action of insulin.
J.biol.Chem. 240, 3237 (1965 b)

DAVORAN, P.R., u. E.W. SUTHERLAND: The effect of L-epinephrine and other agents on the synthesis and release of adenosine 3',5' phosphate by whole pigeon erythrocytes. J. biol.Chem. 238, 3009 (1963)

DENTON, R.M., R.E.YORKE u. P.J. RANDLE: Measurements of concentration of metabolites in adipose tissue and effects of insulin, alloxan-diabetes and adrenalin. Biochem.J. 100, 407 (1966)

DENTON, R.M., and P.J.RANDLE: Citrate and the regulation of adipose tissue phosphofructokinase. Biochem.J. 100, 420 (1966)

DIETRICH,L.S., L.M.FRIEDLAND u.L.A.KAPLAN: Pyridine nucleotide metabolism:Mechanism of action of the niacin antagonist 6-amino-nicotinamide. J.biol.Chem. 233, 964 (1958)

EAGON, R.G.: Rate-limiting effects of pyridine nucleotides on carbohydrate catabolic pathways of microorganisms. Biochem.biophys.Res.Comm. 12,274 (1963)

ENGELHARDT, V.A., u. M.E.SAKOV: Mechanism of the Pasteur effect. Biokhimiya 8, 9 (1943)

ENGLAND, P.J., u. P.J.RANDLE: Effectors of rat-heart hexokinase and the control of glucose phosphorylation in the perfused rat-heart. Biochem.J. 105, 907 (1967)

FLATT, J.P., u. E.G.BALL: Studies on the metabolism of adipose tissue. XV. Evaluation of the major pathways of glucose catabolism as influenced by insulin and epinephrine. J.biol.Chem. 239, 675 (1964)

FLATT, J.P., u. E.G.BALL: Studies on the metabolism of adipose tissue. XIX. An evaluation of the major pathways of glucose catabolism as influenced by acetate in the presence of insulin. J.biol.Chem. 241, 2862 (1966)

FRERICHS, H., u. E.G.BALL: Studies on the metabolism of adipose tissue XVI. Inhibition by phlorrizin and phloretin of the insulin-stimulated uptake of glucose. Biochemistry 3, 981 (1964)

FROESCH, E.R., u. J.L.GINGSBERG: Fructose metabolism of adipose tissue. I. Comparison of fructose and glucose metabolism in epididymal adipose tissue of normal rats. J.biol.Chem. 237, 3317 (1964)

FUSE, S., u. H.KOIKEGAMI: On the degenerative changes of the hippocampus and other brain structures induced by the administration of 3-acetyl-pyridine (3-AP). Acta anat.nippon. 36, 330 (1961)

GARLAND, P.B., P.J.RANDLE u. E.A.NEWSHOLME: Citrate as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes and starvation.
Nature 200, 169 (1963)

GOOD C., H.KRAMER u. M.SOMOGYI: The determination of glycogen.
J.biol.Chem. 100, 485(1933)

GRIFFITHS, D.E.: Effects of nicotinamide-adenine-dinucleotide in some partial reactions of oxidative phosphorylation catalyzed by submitochondrial particles.
Biochem.J. 85, 20P (1962)

GUMAA, K.A., F.NOVELLO u.P.McLEAN: The pentose phosphate pathway of glucose metabolism. Hormonal and dietary control of the oxidative and non-oxidative reactions and related enzymes of the cycle in adipose tissue.
Biochem.J. 114, 253 (1969)

HALLIDAY, S.L., A.SLOBODA, L.W.WILL u.J.J.OLESON: 6-Aminonicotinamide and related antagonists. Fed.Proc.16, 190 (1957)

HARRIS, I., u. V.NEUHOFF: Biosynthese, Verteilung und Ausscheidung von 3-Acetyl-6-pyridon, einem Metaboliten des 3-Acetylpyridins.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 253, 221 (1966)

HAYMAN, S., S.S.SHAHINAN, J.N.WILLIAMS, Jr., u. C.A.ELVEHJEM: Effects of 3-Acetylpyridine on pyridine nucleotide formation from tryptophane and niacin.
J.biol.Chem. 217, 225 (1955)

HERKEN, H., u. V.NEUHOFF: Mikroanalytischer Nachweis von Acetylpyridin-adenin-dinucleotid und Acetylpyridin-adenin-dinucleotid-phosphat im Gehirn.
Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 331, 85 (1963)

HERKEN, H., u. V.NEUHOFF: Spektrofluorometrische Bestimmung des Einbaus von 6-Aminonicotinsäureamid in die oxydierten Pyridinnucleotide der Niere.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path.Pharmak. 247, 187 (1964)

HERKEN, H., G.SENFT u. B.ZEMISCH: Die Einschränkung des tubulären Natrium- und Kaliumtransportes durch Biosynthese 6-Aminonicotinamid enthaltender Nucleotide.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 249, 54 (1964)

HERKEN, H., G.SENFT u.B.ZEMISCH: Der Einfluss von 6-Aminonicotinsäureamid auf die Verteilung der Natrium- und Kaliumionen zwischen dem extra- und intracellulären Raum in der Leber und Skelettmuskulatur.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 253, 364 (1966)

HERKEN, H.: Biosynthesis and action of dinucleotides containing 6-aminonicotinamide on membrane transport processes. Arzneim.-Forsch. 18, 1235 (1968)

HERMANN, H., E.M.CLARK u. W.LANDAUER: Muscle development in the crooked necked dwarf mutant in the 3-acetylpyridine treated chick. Acta Embry.Morphol.Exp. 6, 169 (1963)

HERNANDEZ, A., u. A.SOLS: Transport and phosphorylation of sugars in adipose tissue. Biochem. J. 86, 166 (1963)

v.HERRATH, D.: Der Einfluss von 6-Aminonicotinsäureamid auf die Gluconeogenese und auf das Hypophysen-Nebennieren-rinden-System.
Inaug.-Diss.Med.Fak.FU Berlin, (1968)

HERS, H.G., W.VERHUE u. F. van HOOF: The determination of amylo-1,6-glucosidase. Europ.J.Biochem, 2, 257 (1967)

HICKS, S.P.: Pathologic effects of antimetabolites. I. Acute lesions in the hypothalamus, peripheral ganglia and adrenal medulla caused by 3-acetylpyridine and prevented by nicotinamide.
Amer.J.Path. 31, 189 (1955)

HILL, J.B.: The adsorption of I^{131}insulin to glass.
Endocrinology 65, 515 (1959)

HO, R.J., u. B.JEANRENAUD: Insulin-like action of ouabain. I. Effect on carbohydrate metabolism.
Biochim.Biophys.Acta 144, 61 (1967)

HO, R.J., B.JEANRENAUD, Th.POSTERNAK u. A.E.RENOLD: Insulin-like action of ouabain. II. Primary antilipolytic effect through inhibition of adenyl cyclase.
Biochim.Biophys.Acta 144, 74 (1967)

HOFER, H.W., u. D.PETTE: Wirkungen und Wechselwirkungen von Substraten und Effektoren an der Phosphofructokinase des Kaninchen-Skeletmuskels.
Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 349, 1378 (1968)

HUE, L., u. H.G.HERS: A revaluation of the pathway by which glucose is converted into glycogen in liver homogenate. FEBS Letters 3, 41 (1969)

HUIJING, F., u. J.LARNER: On the mechanism of action of adenosine 3', 5' cyclophosphate. Proc.Natl.Acad.Sci.US 56, 647 (1966)

JEANRENAUD, B.: Dynamic aspects of adipose tissue metabolism: A review. Metab.Clin.Exp. 10, 535 (1961)

JEANRENAUD, B., u. A.E.RENOLD: Studies on rat adipose tissue in vitro. IV. Metabolic patterns produced in rat adipose tissue by varying insulin and glucose concentrations independently from each other.
J.biol.Chem. 234, 3082 (1959)

JEDEIKIN, L.A., u. S.WEINHOUSE: Metabolism of neoplastic tissue. VI. Assay of oxidized and reduced DPN in normal and neoplastic tissue.
J.biol.Chem. 213, 271 (1955)

JOHNSON, M.J., u. J.D.McCOLL: 6-Aminonicotinamide - a potent nicotinamide antagonist. Science 122, 834 (1955)

JOHNSON, M.J., u.J.D. McCOLL: Antimetabolite activity of 6-aminonicotinamide. Fed. Proc. 15, 284 (1956)

JUNGAS, R.L., u. E.G.BALL: Studies on the metabolism of adipose tissue. XII. The effects of insulin and epinephrine on free fatty acids and glycerol production in the presence and absence of glucose.
Biochemistry 2, 383 (1963)

KAISER, I.: Persönliche Mitteilungen (1968)

KAPLAN, N.O., u. M.M. CIOTTI: The 3-acetylpyridine analogue of DPN. J. amer.chem.Soc. 76, 1713 (1954)

KAPLAN, N.O., u. M.M.CIOTTI: Chemistry and properties of 3-acetyl pyridine analogues of diphosphopyridine nucleotide.
J.biol.Chem. 221, 823 (1956)

KAPLAN, N.O., M.M. CIOTTI u. F.E.STOLZENBACH: Reaction of pyridine nucleotide analogues with dehydrogenases.
J.biol.Chem. 221, 833 (1956)

KAPLAN, N.O., M.M. CIOTTI u. F.E.STOLZENBACH: Studies on the interactions of diphosphopyridine nucleotide analogues with dehydrogenases.
Arch.Biochem.Biophys. 69, 441 (1957)

KAPLAN, N.O., A.GOLDIN, St. R.HUMPHREYS, M.M.CIOTTI u. F.E. STOLZENBACH: Pyridine nucleotide synthesis in the mouse.
J.biol.Chem. 219, 287 (1956)

KAPLAN, N.O., A.GOLDIN, St. R.HUMPHREYS, M.M.CIOTTI u. J.M. VENDITTI: Significance of enzymatically catalysed exchange reactions in chemotherapy. Science 120, 437 (1954)

KEMP, R.G., u.P.B.FOREST: Reactivity of the sulfhydryl groups of muscle phosphofructokinase. Biochem.7, 2596 (1968)

KIPNIS, D.M., u. C.F.CORI: Studies of tissue permeability. III. The effect of insulin on pentose uptake by the diaphragm. J.biol.Chem. 224, 681 (1957)

KIPNIS, D.M., u. F.C.CORI: Studies of tissue permeability. V. The penetration and phosphorylation of 2-deoxyglucose in the rat diaphragm.
J.biol.Chem. 234, 171 (1959)

KIPNIS, D.M., E.HELMREICH u. C.F.CORI: Studies of tissue permeability. IV. The distribution of glucose between plasma and muscle.
J.biol.Chem. 234, 165 (1959)

KREBS, E.G., D.S.LOVE, G.E.BRATVOLD, K.A.TRAYSER, W.L.MEYER u. E.H.FISCHER: Purification and properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase-b-kinase.
Biochem. 3, 1022 (1965)

KREBS, H.A., u. K.HENSELEIT: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper.
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 210, 33 (1932)

KUJALOWA, V., u. B.NOSINGER: Cold and ouabain sensitive uptake of glucose stimulated by insulin incubated rat adipose tissue.
Biochim.Biophys.Acta 127, 255 (1966)

KUO, J.F., I.K.DILL u. C.E.HOLMLUND: Inhibition by phlorizin of insulin and protease-stimulated glucose utilization in isolated adipose cells.
Biochim.Biophys.Acta 144, 252 (1967)

LANDAU, B.R., u. E.A.H.SIMS: On the existence of two separate pools of glucose-6-phosphate in rat diaphragm.
J.biol.Chem. 242, 163 (1967)

LARNER, J.: Hormonal and nonhormonal control of glycogen metabolism. Transactions N.Y.Acad.Sci. 29, 192 (1966)

LELOIR, L.F. u. C.E.CARDINI: Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. J.amer.chem.Soc. 79, 6340 (1957)

LELOIR, L.F. u. S.H.GOLDEMBERG: Synthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose in liver.
J.biol.Chem. 235, 919 (1960)

LELOIR, L.F., J.M.OLAVARRÍA, S.H.GOLDEMBERG u. H.CARMINATTI: Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. Arch.Biochem.Biophys. 81, 508(1959)

LEONARDS, J.R. u. B.R.LANDAU: A study of the equivalence of metabolic patterns in rat adipose tissue: Insulin versus glucose concentration. Arch.Biochem.Biophys. 91, 194 (1960)

LINEWEAVER, H. u. D.BURK: The deformation of enzyme dissociation constants. J.amer.Chem.Soc. 56 658 (1934)

LING, K.H., F.MARCUS u. F.A.LARDY: Purification and some properties of rabbit muscle phosphofructokinase.
J.biol.Chem. 240, 1893 (1965)

LIPMANN, F. u. C.L.TUTTLE: A specific micromethod for the determination of acyl phosphates. J.biol.Chem. 159, 21 (1945)

LOWRY, O.H. u. J.V.PASSONEAU: A comparison of the kinetic properties of phosphofructokinase from bacterial, plant and animal sources. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path. u. Pharmak. 248, 185 (1964)

LOWRY, O.H. u. J.V.PASSONEAU: Relationships between substrates and enzymes of glycolysis. J.biol.Chem. 239,31 (1964)

LOWRY, O.H., J.V.PASSONEAU, F.X.HASSELBERGER u. D.W.SCHULTZ: Effects of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. J.biol.Chem. 239, 18 (1964)

LYNEN, F.: In B.K.Wright (Ed.) Control mechanisms in respiration and fermentation. The Ronald Press C. New York, 1963 p. 289

MADSON, N.B.: The inhibition of glycogen phosphorylase by uridine diphosphate glucose. Biochem. biophys.Res. Comm. 6, 310 (1961)

MANSOUR, T.E. : Studies on heart phosphofructokinase: Active and inactive forms of the enzyme. J. biol. Chem. 238, 2285 (1963)

MANSOUR, T.E. u. J.M.MANSOUR: Effects of serotonin (5-Hydroxytryptamine) and adenosine 3', 5'-phosphate on phosphofructokinase from the liver fluke. (fasciola hepatica). J.biol.Chem. 237, 629 (1962)

MANSOUR, T.E., N.W.WAKID u. H.Mae SPROUSE: Purification crystallization and properties of activated sheep heart phosphofructokinase. Biochem.biophys. Res.Comm. 19, 721 (1965)

Mc-DANIEL, E.C., J.M.HUNDLEY u. W.H.SEBRELL: Niacin and antiniacin activity of 3-acetyl-pyridine in dogs. J. Nutrition, 55, 623 (1955)

MILSTEIN, S.W.: Oxydation of specifically labelled glucose by rat adipose tissue. Proc.Soc.exp. Biol.(N.Y.) 92, 632 (1956)

de la MORA, P.M., R.TAPIA u. G.H.MASSIEU: Study of the effect of 3-acetylpyridine on blood glucose concentration. Biochem.Pharmac. 17, 899 (1968) Pergamon Press.

MORGAN, H.E., E.CADENCAS, D.M.REGEN u. C.R.PARK: Regulation of glucose uptake in muscle. II. Rate limiting steps and effects of insulin and anoxia in heart muscle from diabetic rats. J.biol.Chem. 236, 262 (1964)

MORGAN, H.E., M.J.HENDERSON, D.M.REGEN u. C.R.PARK: Regulation of glucose uptake in muscle. I. The effects of insulin and anoxia on glucose transport and phosphorylation in the isolated perfused heart of normal rats. J.biol.Chem. 236, 253 (1961)

MORGAN, H.E. u. A.PARMEGGIANI: Regulation of glycogenolysis in muscle. II. Control of glycogen phosphorylase reaction in isolated perfused heart. J.biol.Chem. 239, 2435 (1964)

MORGAN, H.E. u. A.PARMEGGIANI: Regulation of glycogenolysis in muscle: Control of muscle glycogen phosphorylase activity. J.biol.Chem. 239, 2440 (1964)

MORGAN, H.E., D.M.REGEN, C.R.PARK: Identification of a mobile carrier-mediated sugar transport system in muscle. J.biol.Chem. 239, 369 (1964)

NANNI, G. u. F.M.BACCINI: Cellular enzymatic modifications after subacute 6-aminonicotinamide poisoning. Ital.J.Biochem. 10, 550 (1961)

NANNI, G., U.M.MARINI u. F.M.BACCINO: Metabolic modifications of mitochondria following treatment with 6-aminonicotinamide. Ital.J.Biochem. 10, 275 (1961)

NARAHARA, H.T. u. P.ÖZAND: Study on tissue permeability. IX. The effect of insulin on the penetration of 3-methyl-glucose-H^3 in frog muscle. J.biol. Chem. 238, 40 (1963)

NARAHARA, H.T., H.H.TOMIZAWA, R.MILLER u. R.H.WILLIAMS: Intracellular distribution of an insulin-inactivating system of liver. J.biol.Chem. 217, 675 (1955)

NEUBERT, D., R.A.CHAPLAN u. H.COPER: Inhibition of succinate oxidation by DPN and DPN-analogues in sub-mitochondrial systems. Biochembiophys.Res.Comm. 12, 236 (1963)

NEUBERT, D. u. H.COPER: Die Geschwindigkeit der "malic enzyme"-Reaktion in Gegenwart von NADP-Analoga. Biochem. Zeitschrift, 341, 485 (1965)

NEUHOFF, V.: Mikromethode zur Bestimmung von 3-APAD und 3-Acetylpyridin. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path. u. Pharmak. 245, 49 (1963)

NEWSHOLME, E.A. u. P.J.RANDLE: Regulation of glucose uptake 5. Effects of anoxia, insulin, adrenaline and prolonged starving on concentrations of hexose phosphates in isolated rat diaphragm and perfused isolated rat heart. Biochem. J. 80, 655 (1961)

OREVI, M., E.GORIN u. E.SHAFRIR: Regulation of glycolysis in adipose tissue. Proceed.Israel J.Chem. 7, 164 p (1969)

PÄTAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (eine t-Tafel). Biol. Zbl. 63, 154 (1943)

PAETKAU, V. u. H.A.LARDY: Phosphofructokinase: Correlation of physical and enzymatic properties. J. biol.Chem. 242, 2035 (1967)

PARK, C.R., H.E.MORGAN, M.J.HENDERSON, D.M.REGEN, E.CADENCAS, u. R.L.POST: The regulation of glucose uptake in muscle as studied in the perfused rat heart. (In G.Pincus, Editor) Recent progress in hormone research. Vol. 17, Acad.Press Inc. New York, 1961, page 493.

PARKER, J.C. u. J.F.HOFFMAN: The role of membrane phosphoglycerat-kinase in the control of glycolytic rate by active cation transport in human red blood cells. J.Gen.Physiol. Vol. 50 Nr. 4, 893 (1967)

PARMEGGIANI, A. u. R.H.BOWMAN: Regulation of phosphofructokinase activity by citrate in normal and diabetic muscle. Biochem. biophys. Res.Comm., 12, 268 (1963)

PARMEGGIANI, A. u. E.G.KREBS: Crystallization of rabbit muscle phosphofructokinase. Biochem.biophys.Res. Comm., 19, 84 (1965)

PARMEGGIANI, A., D.S.LOVE u. E.G.KREBS: Purification and properties of rat muscle phosphofructokinase. Fed.Proceed. 23, 533 (1964)

PARR, C.W.: Inhibition of phosphoglucose-isomerase. Nature, 178, 1401 (1956)

PARR, C.W.: Competitive inhibitors of phosphoglucose-isomerase. Biochem.J. 65, 34 p (1957)

PASSONEAU, J.V. u. O.H.LOWRY: Phosphofructokinase and the Pasteur Effect. Biochem.biophys.Res.Comm. 7, 10 (1962)

PASSONEAU, J.V. u. O.H.LOWRY:Phosphofructokinase and the control of the citric acid cycle. Biochem.biophys.Res. Comm. 13, 372 (1963)

POGSON, C.J. u.R.M.DENTON: Effects of alloxan-diabetes, starvation and refeeding on glycolytic-kinase activities in rat epididymal adipose tissue. Nature, 216, 156 (1967)

POGSON, C.J.: Two interconvertible forms of pyruvate-kinase in adipose tissue. Biochem.biophys. Res.Comm. 30, 297 (1968)

RALL, T.W. u. E.W.SUTHERLAND: Adenyl cyclase II. The enzymaticall catalyzed formation of adenosine 3', 5'-phosphate and inorganic pyrophosphate from adenosine triphosphate. J.biol.Chem. 237, 1228 (1962)

RANDLE, P.J., P.B.GARLAND, C.N.HALES u. E.A.NEWSHOLME: The glucose fatty-acid cycle. Its roll in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet, 1, 785 (1963)

RANDLE, P.J. u. H.E.MORGAN: In R.S.Harris and I.C.Wool (Editors) Vitamins and Hormones Vol. 20 Acad.Press Inc. New York (1962) p. 199

RENOLD, A.E., C.E.CROFFORD, W.STAUFFACHER u. R.JEANRENAUD: Hormonal control of adipose tissue metabolism with special reference to the effects of insulin. Diabetologia 1, 4 (1965)

RENOLD, A.E., D.B.MARTIN, Y.M.DAGENAIS, J.STEINKE, J.NICKERSON u. M.SHEPS: Measurements of small quantities of insulin-like activity using rat adipose tissue. I. A proposed procedure. J.Clin. Invest. 39,1487 (1960)

RILEY, G.A.: Action of adenosine 3', 5'-phosphate in dog liver preparations. Fed. Proced. 22, 258 (1963)

RILEY, G.A. u. R.J.HAYNES: The effect of adenosine 3', 5'-phosphate on phosphorylase activity in beef adrenal cortex. J.biol.Chem. 238, 1563 (1963)

ROGNSTAD, R.: The pyruvate cycle in adipose tissue. Arch. Biochem. Biophys. 129, 13 (1969)

van ROSSUM, G.D.Y.: Effects of potassium, ouabain and valinomycin on the efflux of $^{24}Na^{+}$ and pyridine nucleotides of rat liver slices. Biochem.Biophys.Acta, 122, 323 (1966)

SCHACHT, U.: Der Einfluss von 6-Aminonicotinsäureamid auf den Catecholamin- und ATP-Gehalt der Nebennieren. Inaug.-Diss.Med.Fak., FU Berlin (1965)

SCHACHT, U., G.SCHULTZ u. G.SENFT: Cathecholamin und ATP-Gehalt der Nebennieren nach Gabe von 6-Aminonicotinsäureamid. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path u.Pharmak. 253, 355 (1966)

SCHREIBER, V., F.FISCHER u. V.KMENTOVA: Some metabolic and endocrine changes in acute 3-Acetylpyridine poisoning in rats. Physiol.Bohemoslovenica, 11, 212 (1962)

SCHULTZ, G., G.SENFT, W.LOSERT u. U.SCHACHT: Zum Mechanismus der 6-Aminonicotinsäureamid-Hyperglykämie. Naunyn Schmiedebergs Arch.exp.Path. u. Pharmak. 253, 345 (1966)

SHAFRIR, E., B.SHAPIRO u. E.WERTHEIMER: Glycogen metabolism in adipose tissue. Handbook of Physiology (Washington) 5, 313 (1965)

SHAPIRO, D.M., L.S.DIETRICH u. M.E.SHILS: Quantitative biochemical differences between tumor and host as a basis for cancer chemotherapy. V. Niacin and 6-Aminonicotinamide. Cancer Res. 17, 600 (1957)

SHEPS, M.C., R.J.NICKERSON, Y.M.DAGENAIS, J.STEINKE, D.B.MARTIN u. A.E.RENOLD: Measurement of small quantities of insulin-like activity using rat adipose tissue. II. Evaluation of performance. J. Clin.Invest. 39, 1499 (1960)

SPANO, P.T., L.VARGIU, F.CRABI, S.CONGIU, R.GESSA u. L.GESSA: The content and the distribution of adipose tissue norepinephrine in different animal species. Boll. Soc.Ital.Biol. Speriment. 43, 640 (1967)

STERNBERG, S.S. u. F.S.PHILIPS: 6-Aminonicotinamide and acute degenreative changes in the central nervous system. Science, N.Y. 127, 644 (1958)

STOCK, K. u. E.WESTERMAN : Concentration of norepinephrine serotonin and histamine and of amine metabolizing enzymes in mammalian adipose tissue. J.Lipid.Res. 4, 297 (1963)

STONE, D.B. u. T.E.MANSOUR: Phosphofructokinase from the liver fluke (Faciola hepatica). I. Activation by adenosine 3', 5'-phosphate and serotonin. Molec. Pharmac, 3, 161 (1967)

STONE, D.B. u. T.E.MANSOUR: Phosphofructokinase from the liver fluke (Faciola hepatica). II. Kinetic properties of the enzyme. Molec.Pharmac. 3, 177, (1967)

STREUBEL, J.: unveröffentlichte Versuche.

SUTHERLAND, E.W. u. T.W.RALL: The relation of adenosine 3', 5'-phosphate and phosphorylase to the action of catecholamines and other hormones. Pharmacol. Rev. 12, 265 (1960)

SUTHERLAND, E.W., T.W.RALL u. T.MENON: Adenyl Cyclase. I. Distribution, preparation and properties. J.biol. Chem. 237, 1220 (1962)

UMBREIT, W.W., R.H.BURRIS u. J.F.STAUFFER: Manometric techniques, Minneapolis (1959)

UNDERWOOD, A.H. u. E.A.NEWSHOLME: Properties of phosphofructokinase from rat liver and their realtion to the control of glycolysis and gluconeogenesis. Biochem. J. 95, 868 (1965)

VEIT, J.: Zur Toxikologie und Pharmakologie des 3-Acetylpyridins bei Ratten. Inaug.-Diss.Med.Fak. FU Berlin (1965)

VILLAR-PALASI, C. u. J.LARNER: Insulin-mediated effect on the activity of UDPG-glycogen transglucosylase of muscle. Biochem. Biophys. Acta, 39, 171 (1960)

VILLAR-PALASI, C. u. J.LARNER: Insulin treatment and increased UDPG-glycogen transglucosylase activity in muscle. Arch.Biochem. 94, 436 (1961)

VIÑUELA, E., M.L.SALAS u. A.SOLS: End product inhibition of yeast phosphofructokinase by ATP. Biochem.biophys. Res.Comm. 12, 140 (1963)

VOSS, H.J.: Inaug.-Diss.Med.Fak.FU Berlin (im Druck)

WEBER, G., G.BANERJEE u. J.ASHMORE: Activities of enzymes involved in glycolysis, glucogenesis and hexosemonophosphate shunt in rat adipose tissue. Biochem. biophys. Res. Comm. 3, 182, (1960

WEBER, G., H.J.HIRD, N.B.STAMM u. D.S.WAGLE: Enzymes involved in carbohydrate metabolism in adipose tissue. Handbook of Physiol. (Washington) 5, 225 (1965)

WHITE, L.W., H.R.WILLIAMS u. B.R.LANDAU: Metabolism of pyruvate by rat adipose tissue in vitro. Arch. Biochem. Biophys., 126, 552 (1968)

WILLING, F., V.NEUHOFF u. H.HERKEN: Der Austausch von 3-Acetylpyridin gegen Nicotinsäureamid in den Pyridinnucleotiden verschiedener Hirnregionen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path. u. Pharmal. 247, 254 (1964)

WINEGRAD, A.I. u. A.E.RENOLD: Studies on adipose tissue in vitro. II. Effects of insulin on the metabolism of specifically labelled glucose. J.biol.Chem. 233, 273 (1958)

YOUNATHAN, E.S., V.PAETKAU u. H.A.LARDY: Rabbit muscle phosphofructokinase. Reactivity and function of thiol groups. J.biol. Chem. 243, 1603 (1968)

ZESCH, A.: Einfluss Na⁺-eliminierender Substanzen auf den Gehalt an reduziertem Glutathion in der Rattenniere. Inaug.Diss.Med.Fak. FU Berlin (1968)

Herrn Professor Dr. med. H. Herken danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die wertvollen Anregungen, sein stetes Interesse und die Förderung, die die Anfertigung dieser Arbeit im Pharmakologischen Institut ermöglichten.

Herrn Professor Dr. med. Dipl. Chem. Franz v. Bruchhausen gilt mein besonderer Dank für die vielen Ratschläge bei der Ausführung der Versuche und die ständige Bereitschaft zur Diskussion der Schwierigkeiten, die sich theoretisch und praktisch ergaben.

LEBENSLAUF

Am 12. 11. 1939 wurde ich als ältester Sohn des Gutsbesitzers Samuel Kwaku Nkansah und seiner Ehefrau Amma geb. Kumah in Bechem/Ghana geboren.
1945 bis 1954 besuchte ich die römisch-katholische Volks- und Mittelschule in Bechem und danach das "Prempeh College" in Kumasi/Ghana, und erwarb 1958 das "West African Cambridge School Certificate" und 1960 das "Cambridge Higher School Certificate".
Oktober 1961 reiste ich nach West-Deutschland und besuchte zunächst das Goethe-Institut in Radolfzell am Bodensee.
April 1962 kam ich nach Berlin und begann zum Sommersemester desselben Jahres mit dem Medizin-Studium an der Freien Universität, Berlin.
Die ärztliche Vorprüfung legte ich April 1964 und das Staatsexamen am 25. 9. 1967 an der Freien Universität Berlin ab.
Als Medizinalassistent arbeitete ich im Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin, wo ich mit der vorliegenden Arbeit begann, auf der chirurgischen Abteilung des städtischen Krankenhauses, Moabit, auf der inneren Abteilung des städtischen Behring Krankenhauses und auf der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe im städtischen Krankenhaus Auguste Viktoria.
Seit dem 5. 1. 1970 bin ich als wissenschaftlicher Assistent im Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin tätig.

B. Ladewig · Dissertationsdruck · 1 Berlin 12 · Pestalozzistr. 105 · Tel. 318885